

**Modulation von Retrovirus-spezifischen
CD8⁺ T Zellantworten durch
Interferon α Subtypen**

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Julia Dickow

aus Berlin
Oktober 2017

Für meine Großeltern Heiner & Waltraud

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

2. Gutachter: Prof. Dr. Astrid M. Westendorf

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	4
1.2	Typ I Interferone	10
1.2.1	Induktion von Typ I Interferonen.....	10
1.2.2	Typ I Interferon-induzierte Signalwege.....	11
1.2.3	Antivirale Eigenschaften von Typ I Interferonen.....	14
1.2.4	Immunmodulatorische Eigenschaften von Typ I Interferonen	15
1.2.5	Antiproliferative Eigenschaften von Typ I Interferonen.....	17
1.2.6	Strategien der viralen Immunevasion der Typ I Interferon Antwort	18
1.2.7	Therapeutische Nutzung von IFN α	19
1.2.8	Rolle von verschiedenen IFN α Subtypen	20
1.3	Retroviren	21
1.3.1	Aufbau von Retroviren	21
1.3.2	Replikationszyklus von Retroviren	22
1.3.3	Das Friend Retrovirus	24
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	28
2	Material	29
2.1	Geräte.....	29
2.2	Verbrauchsmaterial.....	30
2.3	Chemikalien und Nährmedien.....	32
2.4	Kommerzielle Standardkits	33
2.5	Puffer, Lösungen und Nährmedien	34
2.6	Tetramere und Peptide	36
2.7	Antikörper	37
2.7.1	Antikörper für Durchflusszytometrie	37
2.7.2	Antikörper für Western Blot	38
2.7.3	Sonstige Antikörper	38

2.8	Versuchstiere	39
2.8.1	Wildtypmäuse.....	39
2.8.2	Knockout (^{-/-}) Mäuse.....	39
2.8.3	Transgene Mäuse	40
2.9	Zelllinien	41
2.10	Bakterien.....	41
2.11	Plasmide	41
2.12	Oligonukleotide	43
2.13	Software.....	43
3	Methoden	44
3.1	Zellkultur.....	44
3.1.1	Kultivierung von Zellen.....	44
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	44
3.1.3	Zellzahlbestimmung	45
3.2	Herstellung von Interferonen	46
3.2.1	Vermehrung von Plasmiden.....	46
3.2.2	Kalzium-Phosphat-Transfektion	46
3.2.3	Bestimmung der Interferonkonzentration mit Hilfe eines Mx/Rage7-Bioassays.....	47
3.3	<i>In vitro</i> Versuche mit primären Mauszellen	48
3.3.1	Organentnahme aus Mäusen.....	48
3.3.2	Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen	48
3.3.3	Generierung von DCs aus Knochenmarkstammzellen.....	49
3.3.4	Sortieren und Isolieren von CD8 ⁺ T Zellen aus einem Milzzellgemisch mittels MACS	49
3.3.5	Färbung von Zellen mit fluoreszierenden Zellfarbstoffen	50
3.3.6	Proliferationstest	50
3.3.7	<i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest.....	51
3.4	Herstellung und Nachweis von Friend Virus	52
3.4.1	<i>In vivo</i> Herstellung eines Friend Virus Stocks	52
3.4.2	Herstellung eines F-MuLV Stocks <i>in vitro</i>	52
3.4.3	Nachweis von infektiösen Zellen mit Hilfe des <i>Infectious Center</i> Assays	53

3.5	<i>In vivo</i> Versuche	54
3.5.1	Infektion	54
3.5.2	Intraperitoneale Injektion von IFN α	54
3.5.3	Adoptiver Transfer von TCRtg CD8 $^{+}$ T Zellen und peptid-beladenen DCs	55
3.5.4	<i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest	55
3.6	Durchflusszytometrie	56
3.6.1	Färbung von Oberflächenproteinen	58
3.6.2	Intrazelluläre Färbung von Granzym B	58
3.6.3	Intrazelluläre Färbung von IFN γ , IL-2 und TNF α	59
3.6.4	Intranukleäre Färbung von Transkriptionsfaktoren	59
3.6.5	Tetramerfärbung	60
3.7	Proteinnachweis	60
3.7.1	LEGENDplex TM	60
3.7.2	ELISA	61
3.8	Arbeiten mit RNA	61
3.8.1	Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA	61
3.8.2	cDNA Synthese	61
3.8.3	Quantitative SYBR Green <i>Real Time</i> PCR	61
3.8.4	<i>One Step</i> RT-PCR der isolierten mRNA zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen	63
3.8.5	<i>Two Step</i> RT-PCR für die Quantifizierung von IFN α und IFN β	63
3.8.6	RNA Flow Durchflusszytometrie	64
3.9	Arbeiten mit Proteinen	64
3.9.1	Stimulation von CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs mit IFN α Subtypen	64
3.9.2	Herstellung von Zelllysaten	65
3.9.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	65
3.9.4	SDS Gele	65
3.9.5	SDS Gelelektrophorese	66
3.9.6	Western Blot	66
3.9.7	PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array	67

4	Ergebnisse.....	68
4.1	Immunmodulatorische Effekte von IFNα Subtypen auf Antigen-spezifische CD8$^{+}$ T Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>.....	69
4.1.1	IFN α Subtyp Stimulation supprimiert die Proliferation von CD8 $^{+}$ T Zellen <i>in vitro</i>	69
4.1.2	IFN α Subtyp Stimulation verbessert den Effektorphänotyp von CD8 $^{+}$ T Zellen.....	71
4.1.3	Der antiproliferative Effekt und die Verbesserung der Effektor CD8 $^{+}$ T Zellfunktionen durch IFN α Subtypen sind konzentrations- und zeitabhängig.....	76
4.1.4	Verbesserte Zytotoxizität von CD8 $^{+}$ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation	80
4.1.5	IFN α Subtyp-induzierte immunmodulatorische Effekte auf CD8 $^{+}$ T Zellen sind antigen-unspezifisch	82
4.1.6	IFN α Subtyp Stimulation induziert die Aktivierung und Ausreifung von DCs	87
4.1.7	Die verbesserten Effektorfunktionen von CD8 $^{+}$ T Zellen durch IFN α Subtyp Stimulation wird indirekt durch aktivierte DCs induziert	93
4.1.8	IFNAR Expression auf CD8 $^{+}$ T Zellen ist notwendig für eine effiziente Eliminierung von Zielzellen <i>in vivo</i>	98
4.1.9	Schlussfolgerung.....	100
4.2	Untersuchung der Typ I IFN-induzierten Signalwege	102
4.2.1	Aktivierung verschiedener Typ I IFN Signalwege durch die Stimulation mit IFN α Subtypen <i>in vitro</i>	102
4.2.2	Aktivierung verschiedener Signalwege in CD8 $^{+}$ T Zellen oder DCs durch die Stimulation mit IFN α Subtypen	104
4.3	Immunmodulatorische Effekte von IFNα Subtypen auf CD8$^{+}$ T Zellen während der FV Infektion <i>in vivo</i>	108
4.3.1	Effekt der IFN α Subtyp Behandlung während der akuten FV Infektion	108
4.3.2	Effekt der IFN α Subtyp Behandlung während der chronischen FV Infektion	119

5	Diskussion	126
5.1	Der antiproliferative Effekt verschiedener IFN α Subtypen <i>in vitro</i>	127
5.2	Immunmodulatorische Effekte der IFN α Subtypen	129
6	Zusammenfassungen	138
6.1	Zusammenfassung	138
6.2	Summary.....	139
7	Literaturverzeichnis	141
8	Anhang.....	158
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	158
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	164
8.3	Tabellenverzeichnis	167
8.4	Danksagung	168
8.5	Lebenslauf	169
8.6	Erklärungen	171

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus und bekämpft eingedrungene und körperfremde Strukturen. Neben der Abwehr verschiedenster Krankheitserreger, wie z.B. Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten, kann das Immunsystem auch körpereigene Zellen zerstören (bei Autoimmunität oder Krebs). Dabei hat es zwei unterschiedliche Abwehrmechanismen entwickelt: die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität. Die angeborene Immunantwort erfolgt schnell und ist nicht spezifisch. Im Laufe der Evolution entwickelte sich in Wirbeltieren ein weiterer Mechanismus, durch den eine Antigen-spezifische Erkennung und Bekämpfung von Krankheitserregern ermöglicht wird. Zusätzlich kann sich ein immunologisches Gedächtnis etablieren, welches den Organismus schnell und effektiv vor einer Zweitinfektion des gleichen Erregers schützt [227].

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die angeborene Immunantwort ist der erste Abwehrmechanismus eines Organismus gegen eingedrungene Pathogene. Zum angeborenen Immunsystem gehören Zellen und lösliche Faktoren, aber auch komplexe mechanische und physiologische Barrieren, wie z.B. die Haut oder Schleimhäute. Die angeborene Immunantwort ist antigen-unspezifisch und wird sofort oder innerhalb von Stunden nach Erkennung von pathogenen Strukturen aktiviert. Dabei nehmen Zellen des angeborenen Immunsystems unspezifisch bestimmte und unveränderliche molekulare Strukturen von Krankheitserregern auf, die sog. Pathogen-assoziierten molekularen Muster (engl. *pathogen associated molecular patterns*; PAMPs). PAMPs werden durch membrangebundene oder lösliche Keimbahn-kodierte Rezeptoren erkannt, die sog. mustererkennenden Rezeptoren (engl. *Pattern recognition receptors*; PRRs), die von verschiedenen Immunzellen auf der Zelloberfläche oder in den Endosomen exprimiert werden können. Die Bindung dieser Rezeptoren induziert unterschiedliche Prozesse, wie z.B. die Phagozytose, Chemotaxis, die Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen oder die Sekretion von Zytokinen [110].

1.1.1.1 Lösliche Komponenten des angeborenen Immunsystems

Zu den löslichen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören alle löslichen Faktoren, wie Komplement oder Zytokine. Das Komplementsystem besteht aus einem streng regulierten Netzwerk von Proteinen, welche eine Kaskade verschiedener proteolytischer Enzyme bilden. Durch die Aktivierung des Komplementsystems können Pathogene durch Opsonierung, Chemoattraktoren und lokale Entzündungsreaktionen eliminiert werden [195]. Zytokine dienen der Zell-Zell-Kommunikation. Dabei regulieren sie verschiedene immunologische Abläufe und modulieren z.B. die Art und Intensität einer Immunantwort, sowie deren Dauer. Zu den Zytokinen gehört die Familie der Interferone (IFN), auf die in Kapitel 1.2 genauer eingegangen werden soll. Neben den IFN gibt es noch die Familie der Interleukine (IL), der Tumornekrosefaktoren (TNF), der Kolonie-stimulierenden Faktoren (engl. *Colony-stimulating factor*; CSF) und die der Chemokine. Zytokine nehmen maßgeblich Einfluss auf das Zellwachstum, die Migration, Entwicklung, Differenzierung und Effektorfunktionen von Zellen und können darüber hinaus deren Apoptose induzieren [18, 110].

1.1.1.2 Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören Neutrophile, Eosinophile, natürliche Killer (NK) Zellen und NKT Zellen, sowie die Gruppe der antigen-präsentierenden Zellen (APCs), die Makrophagen und die dendritischen Zellen (DCs).

NK Zellen

NK Zellen sind dazu in der Lage zwischen gesunden und erkrankten körpereigenen Zellen zu unterscheiden [107]. Sie besitzen zytotoxisches Potential und nach Erkennung von virus-infizierten oder entarteten Tumorzellen kann durch die Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen, wie z.B. Granzym B (GzmB) und Perforin, die Apoptose von Zielzellen induziert werden. Darüber hinaus exprimieren NK Zellen Liganden auf ihrer Oberfläche, wie z.B. TRAIL (engl. *TNF related-apoptosis-inducing ligand*) oder den Fas Liganden (FasL). Durch die Bindung an die entsprechenden Rezeptoren können ebenfalls apoptotische Signalwege in den Zielzellen eingeleitet werden [207].

Antigen-präsentierende Zellen

Zu den professionellen APCs des angeborenen Immunsystems gehören die Makrophagen und DCs. Eine dritte wichtige Gruppe stellen die B Zellen dar, diese werden jedoch dem adaptiven Immunsystem zugeordnet. Makrophagen sind langlebige, phagozytierende Zellen, die Krankheitserreger zerstören können, indem sie körperfremde Strukturen durch ihre Oberflächenrezeptoren erkennen und diese aufnehmen. Nachdem die Pathogene intrazellulär abgebaut wurden, werden die entstandenen Antigene durch die Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I (engl. *Major histocompatibility complex I*; MHC I) auf der Zelloberfläche präsentiert. Extrazellulär aufgenommene Pathogene werden in Phagolysosomen abgebaut und über MHC II präsentiert [140]. Zu den Hauptaufgaben von Makrophagen gehört außerdem die Ausschüttung von Signalproteinen, wie z.B. Zytokinen oder Chemokinen, um damit andere Immunzellen zum Infektionsort zu locken und zu aktivieren [152]. DCs unterscheiden sich in ihrer Funktion nur wenig von Makrophagen, allerdings besteht ihre Hauptaufgabe darin, naive T Zellen zu aktivieren und damit die adaptive Immunantwort einzuleiten. DCs befinden sich vor Antigenkontakt zunächst in einem unreifen Stadium, sind in der Peripherie lokalisiert und weisen durch ihre langen Zytoplasmafortsätze, die Dendriten, ihre charakteristische sternenförmige Gestalt auf. Unreife DCs besitzen eine hohe Endozytoseaktivität und exprimieren nur geringe Level an MHC I, MHC II und kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80 (engl. *cluster of differentiation 80*) und CD86. Durch die Aufnahme von eingedrungenen Pathogenen kommt es zur Reifung der DCs und gleichzeitig migrieren sie zu naheliegenden sekundären lymphatischen Organen, um dort B- und T Zellen über die Präsentation von Antigenen zu aktivieren. Reife DCs sind charakterisiert durch hohe Expressionslevel an MHC I, MHC II, kostimulatorischen Molekülen und der Sekretion an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-6, IL-12 und TNF α [48, 137]. Der Mechanismus der Antigenpräsentation stellt somit eine wichtige Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar, um effiziente Immunantworten gegen Pathogene einzuleiten.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort passt sich die adaptive Immunantwort spezifisch an den eingedrungenen Krankheitserreger an. Dabei wird sie durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Bis sich eine effektive adaptive Immunantwort ausgebildet hat, kann es allerdings mehrere Tage dauern. Im Gegensatz zur angeborenen ist die adaptive Immunantwort Antigen-spezifisch und Lymphozyten des adaptiven Immunsystems sind dazu in der Lage, verschiedenste Effektorfunktionen auszuüben und ein immunologisches Gedächtnis zu etablieren. Lymphozyten findet man im Blut, in der Lymphe und den lymphatischen Organen und man unterscheidet dabei zwischen zwei Gruppen, den T Zellen und B Zellen.

B Zellen entwickeln sich direkt aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Zu den wesentlichen Effektorfunktionen von B Zellen gehört die Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern (Immunglobuline; Ig), die zur humoralen Immunantwort gehören, sowie die Präsentation von Antigenen, weshalb sie zu den professionellen APCs zählen. B Zellen können, abhängig oder unabhängig von T Zellen, Antikörper produzieren [74]. Die Aktivierung von B Zellen kann jedoch zusätzlich durch T Zellen gesteuert werden, weshalb man diese auch T Helferzellen nennt.

T Zellen werden im Knochenmark gebildet, wandern in den Thymus und reifen dort aus. Hier werden sie einer Positiv-Negativ-Selektion unterzogen, um eigene Bestandteile des Immunsystems von fremden unterscheiden zu können. Bei der Positivselektion treten T Zellen mit eigenen MHC Molekülen in Kontakt. Erkennen sie diese, sind sie funktionstüchtig und werden vermehrt. Das spätere Erkennen von Komplexen körpereigener MHC Moleküle, in Kombination mit pathogenen Antigenen, löst die Aktivierung dieser T Zellen aus, wodurch eine Immunantwort eingeleitet wird. T Zellen, die keine MHC Moleküle erkennen werden hingegen aussortiert und sterben durch Apoptose. Durch diesen Prozess wird ein Repertoire an T Zellen geschaffen, die die unterschiedlichsten Antigene erkennen können. Sie verlassen den Thymus als naive T Zellen [69].

T Zellen können anhand ihrer Funktion in verschiedene Unterformen eingeteilt werden und lassen sich durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle unterscheiden, die auch als *cluster of differentiation* (CD) bezeichnet werden. CD4 und CD8 sind Glykoproteine und gehören zur Ig Superfamilie. CD4 wird

üblicherweise auf T Helferzellen exprimiert, während CD8 auf zytotoxischen T Lymphozyten zu finden ist. CD4 und CD8 dienen als Co-Rezeptor und spielen gemeinsam mit dem T Zellrezeptor (TCR) eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Antigenen. Nachdem APCs körperfremde Antigene an ihre MHC Moleküle gebunden und auf ihrer Oberfläche präsentiert haben, interagieren Antigen-spezifische CD4⁺ T Zellen ausschließlich mit Peptiden, die an MHC II gebunden sind und Antigen-spezifische CD8⁺ T Zellen mit MHC I. Die Erkennung und Bindung des Antigens induziert die Aktivierung der T Zelle und leitet weitere Immunantworten ein.

Zu den T Helferzellen gehören die pro-inflammatorischen CD4⁺ T Zellen des Typ 1 (T_{H1}), die für die Aktivierung von B Zellen wichtigen CD4⁺ Zellen des Typ 2 (T_{H2}) und die durch die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-9 und IL-17 charakterisierten CD4⁺ T Zellen des Typ 9 (T_{H9}) und des Typ 17 (T_{H17}). Follikuläre Helfer T Zellen (T_{fh}) sind darauf spezialisiert, B Zellen zu aktivieren und induzieren deren Proliferation und Differenzierung. Darüber hinaus gibt es noch die zytotoxischen CD4⁺ T Zellen, die zytolytische Aktivität besitzen und die Apoptose virusinfizierter Zellen auslösen können. Schließlich gibt es die Population der regulatorischen CD4⁺ T Zellen, deren Hauptaufgabe darin besteht, eine überschießende Immunantwort zu regulieren [225]. Die Funktion der regulatorischen CD4⁺ T Zellen ist essentiell, um Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Im Gegensatz dazu kann die Suppression von Immunantworten durch regulatorische CD4⁺ T Zellen jedoch auch dazu führen, dass Effektorfunktionen von Immunzellen während einer Virusinfektion frühzeitig unterdrückt werden und somit eine Eliminierung des Virus verhindern [146, 223]. Jede Zellpopulation erfüllt also bestimmte Effektorfunktionen, die eine Immunantwort fördern, aber auch inhibieren können.

1.1.2.1 CD8⁺ T Zellen

CD8⁺ T Zellen gehören zu den Haupteffektorzellen einer adaptiven Immunantwort gegen Virusinfektionen. Nach Aktivierung erkennen sie virusinfizierte Zellen über MHC I-präsentierte Antigene und können diese direkt über verschiedene Mechanismen abtöten.

Aktivierung von CD8⁺ T Zellen

CD8⁺ T Zellen benötigen für ihre Aktivierung zwei Signale, die durch professionelle APCs zur Verfügung gestellt werden [116, 211]. Zunächst bindet der TCR Komplex

(CD3 und CD8) mit einem Fremdanigen, welches mit Hilfe des MHC I Komplexes auf APCs oder infizierten Zellen präsentiert wird. Zusätzlich werden CD8⁺ T Zellen durch kostimulatorische Moleküle aktiviert. Dieses zweite Signal wird vor allem durch die Aktivierung des auf CD8⁺ T Zellen exprimierten CD28 bereitgestellt, welches mit Oberflächenmolekülen der B7 Familie auf APCs interagiert (CD80 und CD86). Folgt dem ersten Signal kein zweites, aktivierendes Signal, so werden CD8⁺ T Zellen nicht aktiviert. Für eine effektive CD8⁺ T Zellantwort wird ein zusätzliches drittes Signal benötigt, welches durch Zytokine, wie z.B. Typ I IFN oder IL-12 induziert wird [34, 35, 86].

CD8⁺ T Zellen und ihre Effektormoleküle

Zu den Haupteffektormolekülen, die durch CD8⁺ T Zellen sekretiert werden, zählen die pro-inflammatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α [6, 166, 228]. Diese Zytokine können allerdings auch von anderen Immunzellen, wie z.B. CD4⁺ T Zellen, NK Zellen oder APCs ausgeschüttet werden. IFN γ ist das einzige Mitglied der Typ II IFN Familie und bewirkt die Aktivierung von Makrophagen, die Einwanderung von Lymphozyten zum Ort der Infektion, die Maturierung und Differenzierung verschiedener Immunzellen, erhöht die Aktivität von NK Zellen und reguliert B Zellfunktionen [198]. IFN γ kann ebenfalls die Virusreplikation hemmen, bzw. die Viruseliminierung induzieren, indem MHC I Moleküle und das Immunproteasom hochreguliert werden, wodurch eine effiziente Erkennung von virus-infizierten Zellen durch CD8⁺ T Zellen ermöglicht wird. IFN γ hat außerdem durch die Induktion antiviraler Proteine einen direkt antiviralen Effekt und kann zudem antiproliferativ und pro-apoptotisch wirken [198].

TNF α ist ebenfalls ein pleiotropes Zytokin und kann verschiedenste Effekte auf unterschiedliche Immunzellen haben. Es existiert in löslicher Form, kann aber auch membrangebunden seine Wirkung entfalten. TNF α bindet an seinen Rezeptor, den TNF α Rezeptor (TNFR). Er besteht aus zwei Untereinheiten, TNFRI und TNFRII, wobei TNFRI auf allen Zellen exprimiert wird und seine Bindung mit den meisten TNF α -induzierten Effekten assoziiert wird. Die Aktivierung der TNFR Signalkaskade induziert verschiedene Signalwege, die mit Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und Zytokinproduktion assoziiert sind [199]. Des Weiteren kann die Bindung des TNFR, durch sowohl lösliches als auch membrangebundenes TNF α , den programmierten Zelltod, also die Apoptose, in Zielzellen auslösen. Dabei induziert TNF α die

transkriptionelle Aktivierung und die Expression von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies sowie die Aktivierung von verschiedenen Caspasen.

IL-2 ist der wichtigste Wachstumsfaktor von T Zellen und induziert deren Aktivierung und Expansion. Die Hauptproduzenten von IL-2 sind CD4⁺ T Zellen, allerdings können auch CD8⁺ T Zellen große Mengen an IL-2 sekretieren [36]. Autokrin wirkendes IL-2 unterstützt die fortlaufende Expansion von CD8⁺ T Zellen und induziert die Produktion verschiedenster anderer Zytokine (wie z.B. IFN γ , Perforin oder GzmB) [181], wodurch CD8⁺ T Zellen weitere Effektorfunktionen erlangen können. Außerdem wird IL-2 benötigt, um ein immunologisches CD8⁺ T Zell Gedächtnis zu entwickeln [104].

Mechanismus der CD8⁺ T Zell-vermittelten Eliminierung von infizierten Zellen

Virusinfizierte Zellen können auf verschiedene Weise durch CD8⁺ T Zellen eliminiert werden. Zytotoxische Effektor CD8⁺ T Zellen sind charakterisiert durch die Bildung verschiedener zytotoxischer Proteine, wie z.B. das lytische Molekül Perforin und die zu den Proteasen gehörenden Granzyme [100, 224]. Die Freisetzung dieser Moleküle kann die Apoptose in Zielzellen induzieren. Zusätzlich können Fas exprimierende Zielzellen durch FasL Bindung auf CD8⁺ T Zellen abgetötet werden.

Die Interaktion des TCR von CD8⁺ T Zellen mit dem Antigen-MHC I-Komplex induziert die zielgerichtete Verschiebung der intrazellulären Granula zur Kontaktstelle zwischen CD8⁺ T Zellen und infizierter Zelle, der sog. immunologischen Synapse. Dort fusionieren beide Zellmembranen und der Inhalt der Granula wird in den so entstandenen intrazellulären Spalt entleert, wodurch der Zelltod der Zielzelle induziert wird. Bei dieser Exozytose-induzierten Apoptose ist Perforin dafür verantwortlich, Poren in der Membran der Zielzelle zu formen, damit GzmA und GzmB eindringen können. Die Endozytose der Granzyme wird durch den kationenunabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelt und induziert dann die proteolytische Spaltung von Caspasen, was zur Fragmentierung der DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl. *deoxyribonucleic acid*) und Apoptose führen kann [180]. Zusätzlich können Granzyme den Caspase-unabhängige mitochondrialen Zerfall induzieren, der zu der Freisetzung von Cytochrom c führt, ein weiteres pro-apoptotisches Protein [13]. Um sich selbst vor der Wirkung der eigenen ausgeschütteten Granula zu schützen, exprimieren CD8⁺ T Zellen Granzym-spezifische Inhibitoren [212].

Ein weiterer Mechanismus von CD8⁺ T Zellen, virusinfizierte Zellen zu töten, ist die Vermittlung zytotoxischer Aktivität über den Fas-FasL-Weg [221]. Durch Interaktion von FasL, der von CD8⁺ T Zellen exprimiert wird, mit dem Fas Rezeptor auf Zielzellen, kommt es ebenfalls zur Aktivierung von Caspasen, was folglich zur Apoptose führt. Zusätzlich kann die Expression von TRAIL auf CD8⁺ T Zellen die Inaktivierung und Apoptose von anderen Zellen auslösen, indem TRAIL entweder den DR4 (engl. *Death cell receptor 4*) oder DR5 bindet [230].

Gedächtnis Formation von CD8⁺ T Zellen

Eine CD8⁺ T Zellantwort zeichnet sich durch drei charakteristische Phasen aus. In der initialen Phase werden CD8⁺ T Zellen aktiviert, expandieren und erlangen ihre Effektorfunktionen, die maßgeblich zur Eliminierung von virus-infizierten Zellen beitragen [228]. Darauf folgt die Kontraktionsphase, in der die meisten CD8⁺ T Zellen absterben. Die übrig gebliebenen CD8⁺ T Zellen werden zu Gedächtnis CD8⁺ T Zellen und erreichen somit die dritte Phase, in der sich ein immunologisches Gedächtnis etabliert (Abb. 1-1 A). Zwei bis drei Wochen nachdem die Expansion der CD8⁺ T Zellen ihr Maximum erreicht hat, sind also der Großteil (90 bis 95 %) der aktivierten Effektor CD8⁺ T Zellen durch Apoptose gestorben [7]. Die verbliebenen Antigen-spezifischen CD8⁺ T Zellen können dann als Reservoir an langlebigen Gedächtnis CD8⁺ T Zellen verbleiben (Abb. 1-1 B). Allerdings unterscheiden sich Gedächtnis CD8⁺ T Zellen von Effektor CD8⁺ T Zellen, sowohl in ihrem Phänotyp als auch ihrer Funktion und Genexpression [228]. So exprimieren 5 bis 10 % der Effektor CD8⁺ T Zellen hohe Level an CD127, der α -Kette des IL-7 Rezeptors. Genau diese CD8⁺ T Zellen überleben vorzugsweise die Infektion und wandeln sich später zu Gedächtnis CD8⁺ T Zellen um [99]. Im Gegensatz dazu verschwinden in dieser Phase der Gedächtnisformation Effektor CD8⁺ T Zellen, die nur geringe Mengen an CD127 exprimieren. Zusätzlich regulieren CD8⁺ T Zellen während der Effektorphase CD62 Ligand (CD62L) herunter. CD62L ist ein Mitglied der Selektinfamilie und wird normalerweise von vielen Lymphozyten exprimiert. Seine Funktion ist wichtig für die Zelladhäsion. Werden Immunzellen aktiviert, so wird Selektin herunterreguliert und ermöglicht so ihre Mobilität. Sobald sich Gedächtnis CD8⁺ T Zellen ausgebildet haben, wird CD62L wieder hochreguliert und ermöglicht die Lokalisierung in zentralen lymphoiden Organen [228].

Die Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses ermöglicht eine schnelle Reaktivierung Virus-spezifischer T Zellen bei einer zweiten Infektion mit dem gleichen Virus und somit eine effektive Immunabwehr.

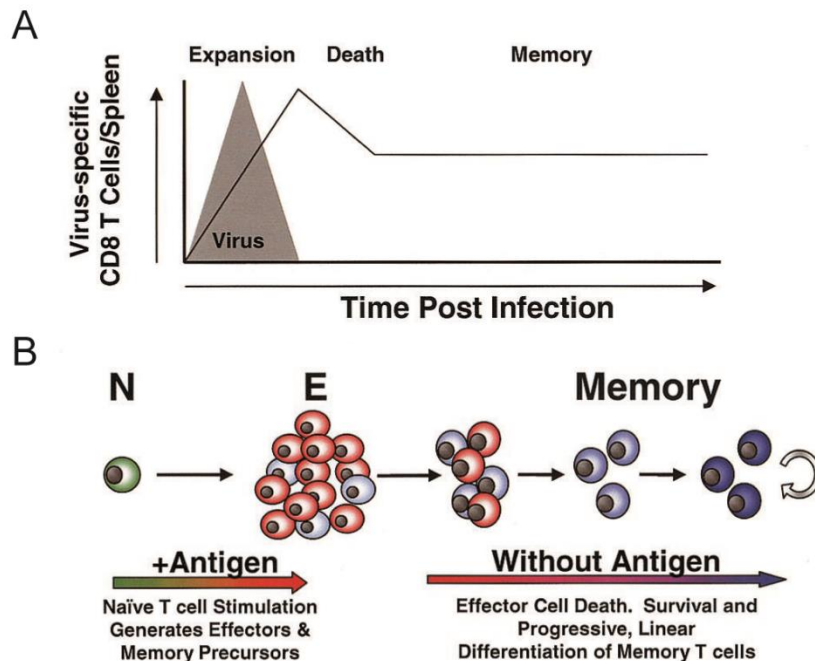


Abb. 1-1 Die Dynamik einer CD8⁺ T Zellantwort während einer viralen Infektion.

(A) Durch eine akute Virusinfektion werden CD8⁺ T Zellen in der ersten Phase zunächst aktiviert und Virus-spezifische Effektor CD8⁺ T Zellen expandieren. Darauf folgt eine Kontraktionsphase, in der viele CD8⁺ T Zellen absterben. In der letzten Phase kann sich ein immunologisches Gedächtnis etablieren. (B) Die verbliebenen Antigen-spezifischen CD8⁺ T Zellen können als langlebige Gedächtnis CD8⁺ T Zellen verbleiben, die bei einer Zweitinfektion mit dem gleichen Virus schnell und effizient reaktiviert werden können (Abb. verändert nach [228]).

Dysfunktionale CD8⁺ T Zellen in chronischen Virusinfektionen

Während chronischer Virusinfektionen können die Funktionen von CD8⁺ T Zellen stark beeinträchtigt sein. Sie verlieren zunächst ihre Effektorfunktionen, wie z.B. die Fähigkeit Zytokine zu sekretieren (zunächst IL-2 gefolgt von TNFα [56]). Dysfunktionale CD8⁺ T Zellen sind zudem durch die Expression inhibitorischer Rezeptoren gekennzeichnet, deren normale Funktion die Kontrolle von Autoreaktivität oder überschüssigen Immunantworten und damit verbundenen pathologischen Schäden ist. Und obwohl inhibitorische Rezeptoren auch von CD8⁺ T Zellen während der Effektorphase exprimiert werden, ist die erhöhte und dauerhafte Expression dieser Rezeptoren ein Kennzeichen von dysfunktionalen CD8⁺ T Zellen während einer chronischen Infektion [242]. Der inhibitorische Signalweg, der durch

den Rezeptor PD-1 (engl. *Programmed cell death-1*) und Bindung seiner Liganden PD-1 Ligand (PD-L1) und PD-L2 reguliert wird, kann die zytotoxischen Funktionen von CD8⁺ T Zellen inhibieren [163]. Darüber hinaus gibt es weitere inhibitorische Moleküle, wie z.B. CTLA-4 (engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), die von T Zellen exprimiert werden können. CTLA-4 ist ein Homolog zu CD28 und da es eine höhere Affinität hat, bindet es bevorzugt an CD80 oder CD86 und verhindert damit die andauernde Co-Stimulation und Aktivierung von CD8⁺ T Zellen [22]. Tim-3 (engl. *T cell immunoglobulin mucin 3*) wird gewöhnlich auf T_H1 Zellen und manchen CD8⁺ T Zellen exprimiert und wirkt als negativer Regulator, der die eigene Apoptose auslösen kann. Tim-3 wird ebenfalls während der chronischen Phase von CD8⁺ T Zellen hochreguliert und ist ein Kennzeichen der Dysfunktion [97, 187].

1.2 Typ I Interferone

Interferone wurden zum ersten Mal 1957 von Isaac und Lindenmann als lösliche Proteine beschrieben, die die Virusreplikation in einer Zellkultur inhibieren konnten [95]. Interferone sind Zytokine, die vom Immunsystem als Folge der Stimulation bestimmter PRRs ausgeschüttet werden. Zu den Interferonen gehören die Typ I, Typ II und Typ III IFN. Den Typ I IFN gehört eine große Familie nah verwandter Zytokine an, u.a. verschiedene Subtypen von IFN α , aber auch IFN β , IFN ϵ , IFN τ , IFN δ und IFN κ , das humane IFN ω , sowie das murine Limitin [178]. Sie besitzen antivirale und antiproliferative Aktivität und können darüber hinaus die Effektorfunktionen von Immunzellen modulieren. Typ II IFN, wozu als einziges das IFN γ gehört, werden vor allem von T Zellen und NK Zellen sekretiert. Typ III IFN wurden als letzte Familie der IFN beschrieben. Es gibt vier verschiedene Subtypen im Menschen (IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 und IFN λ 4) und zwei in der Maus (IFN λ 2 und IFN λ 3; IFN λ 1 ist ein Pseudogen). Wie die Typ I IFN, haben auch Typ III IFN antivirale und immunmodulatorische Funktionen und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Virusinfektionen [49].

1.2.1 Induktion von Typ I Interferonen

Die Expression von Typ I IFN stellt den ersten Abwehrmechanismus gegen eindringende Viren dar. Fast alle Zellen des Körpers können Typ I IFN produzieren,

wobei plasmazytoide DCs zu den Hauptproduzenten von Typ I IFN gehören [203]. Die Ausschüttung von Typ I IFN wird als Antwort auf die Stimulation bestimmter PRRs induziert. Dazu gehören die auf der Oberfläche und in den Endosomen lokalisierten Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. *toll like receptor*, TLR), die im Zytoplasma vorkommenden NOD (*nucleotide binding oligomerization domain*)-ähnlichen Rezeptoren (NLR), sowie die Rezeptoren RIG I (*retinoic acid-inducible gene 1*), MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) und cGAS (*cyclic GMP-AMP [cGAMP] synthase*) [114, 213]. Durch die Aktivierung dieser PRRs, die darauffolgende Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und die Bindung an den IFN β -Promotor wird die Expression früher IFN-Gene, nämlich IFN β und IFN $\alpha 4$, induziert [51, 141].

1.2.2 Typ I Interferon-induzierte Signalwege

Alle Typ I IFN binden an den gleichen Rezeptor, den IFN α/β -Rezeptor (IFNAR). Dieser heterodimere Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2, und kommt auf fast allen Zellen vor [38]. Durch die Bindung des Rezeptors werden verschiedene Signalwege aktiviert, die alle die Transkription hunderter IFN stimulierter Gene (ISGs) induzieren. Der zuerst beschriebene Signalweg, der durch die Bindung von Typ I IFN an IFNAR induziert wird, ist der JAK/STAT (*Janus activated kinase–signal transducer and activation of transcription*) Signalweg. Allerdings weiß man heute, dass neben dem klassischen JAK/STAT-Signalweg, weitere Typ I IFN-induzierte Signalwege existieren [85].

1.2.2.1 Der klassische JAK/STAT Signalweg

Jede Untereinheit des IFNAR ist über ihre zytoplasmatische Domäne mit einer Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase verbunden: IFNAR1 mit der Tyrosinkinase 2 (TYK2) und IFNAR2 mit der Januskinase 1 (JAK1). Sobald die extrazelluläre Domäne des IFNAR durch Typ I IFN gebunden wird, erfolgt die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch die Tyrosinkinasen aktiviert werden. Tyrosinreste am Ende der zytoplasmatischen IFNAR Domäne können nun phosphoryliert werden. Die so entstandenen Phosphotyrosylreste dienen als Bindungsstelle für SH₂ (*src-homolgy 2*)-enthaltende Signalmoleküle, STAT-1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) und STAT-2. Die Anlagerung der STAT

Moleküle führt zur Phosphorylierung der Tyrosinreste (Y7101 für STAT-1 und Y690 für STAT-2), wodurch STAT-1 und STAT-2 dimerisieren. Dieses Heterodimer bindet den sog. IRF9 (engl. *Interferon regulatory factor 9*) und formt mit ihm den ISGF3 Transkriptionsfaktor-Komplex (ISGF3, engl. *Interferon stimulated gene factor 3*). ISGF3 transloziert in den Zellkern, wo er spezifisch an seiner Konsensussequenz, dem ISRE Element (engl. *IFN-stimulated response element*) bindet und die Transkription von ISGs induziert [85, 96] (Abb. 1-2).

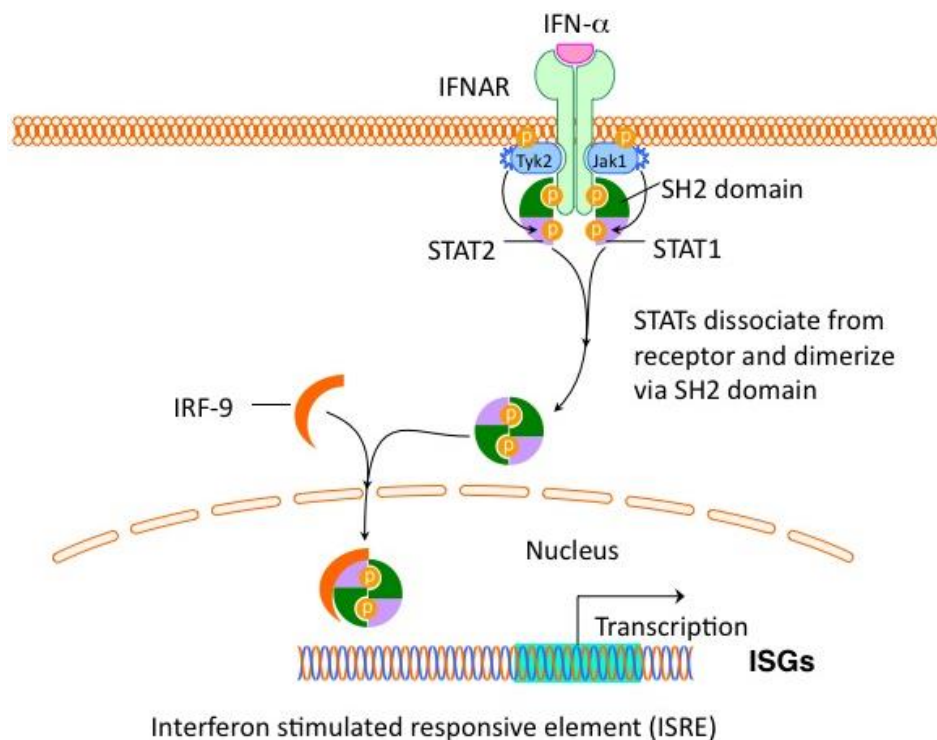


Abb. 1-2 Der klassische JAK/STAT-Signalweg [143]

1.2.2.2 Alternative Typ I Interferon-induzierte Signalwege

Es wurde gezeigt, dass neben dem klassischen JAK/STAT-Signalweg, bei dem die Proteine STAT-1 und STAT-2 rekrutiert und phosphoryliert werden, der JAK/STAT-Signalweg unter der Beteiligung weiterer phosphorylierter STAT Moleküle, wie STAT-3 und STAT-5, induziert werden kann [32, 182]. STAT-4 und STAT-6 können ebenfalls durch Typ I IFN Stimulation aktiviert werden, allerdings scheint dies auf bestimmte Zelltypen beschränkt zu sein [85]. Nachdem die STAT Moleküle phosphoryliert werden, bilden sie entweder Homodimere (STAT-1, STAT-3, STAT-4, STAT-5 und STAT-6) oder Heterodimere (STAT-1/2, STAT-1/3, STAT-1/4, STAT-1/5,

STAT-2/3 und STAT-5/6), welche ebenfalls in den Zellkern translozieren und dort andere regulatorische Sequenzen als das ISRE binden können, u.a. GAS (engl. *IFN γ -activated sites*).

Neben dem klassischen und alternativen JAK/STAT-Signalweg können weitere Typ I IFN-induzierte Signalwege aktiviert werden, z.B. der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg oder NF- κ B (engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) Signalweg [182]. Nach Aktivierung induzieren TYK2 und JAK1 die Phosphorylierung von IRS1 (engl. *insulin receptor substrate 1*) und IRS2, wodurch PI3K die Möglichkeit hat, daran zu binden. STAT-3 wirkt dabei als Adaptermolekül zwischen PI3K und IFNAR. Daraufhin aktiviert PI3K die Serin-Threonin-Kinase AKT, die wiederum mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*) aktiviert. Außerdem kann AKT die Aktivierung der I κ B Kinase (IKK) β induzieren, was zur Aktivierung von NF- κ B führt. NF- κ B kann auch alternativ aktiviert werden, was letztendlich von der Beteiligung der IKK α abhängt. Dabei induzieren beide IKK die Abspaltung von I κ B α (engl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), einem inhibitorischen Protein, welches an den Transkriptionsfaktor NF- κ B gebunden ist. Erst nach Ablösen von I κ B α liegt NF- κ B im aktiven Zustand vor und kann in den Zellkern translozieren, um dort die Expression von ISGs zu induzieren. Im Allgemeinen unterstützt die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs das Überleben von Zellen und erhöht die Expression von verschiedenen GTP (Guanosintriphosphat)-bindenden Proteinen, die z.B. in der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation involviert sind.

Durch die IFNAR Stimulation kann zusätzlich der MAPK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) Signalweg aktiviert werden [47]. Die Bindung von IFNAR führt zur Phosphorylierung von TYK2, wodurch über eine Signalkaskade sowohl die p38 Kinase als auch die extrazellulären Signal-regulierenden Kinasen (ERK) 1 und 2 aktiviert werden können. Die Translokation von p38 in den Zellkern initiiert die Expression diverser Gene mit antiviraler und antileukämischer Wirkung und kann Wachstumsinhibitoren induzieren [85]. Die Aktivierung von ERK1/2 und die darauffolgende Aktivierung diverser Gene reguliert u.a. das Zellwachstum und die Differenzierung von Zellen.

Ein weiterer Typ I IFN-induzierter Signalweg ist der CRKL (*v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like*) Signalweg. Die Bindung von IFNAR induziert hier die

Phosphorylierung von CRKL und die Formation eines CRKL-STAT-5-Komplexes, der im Zellkern die Transkription von ISGs reguliert [1, 125].

Eine Übersicht der verschiedenen Typ I IFN Signalwege ist in Abb. 1-3 zu sehen.

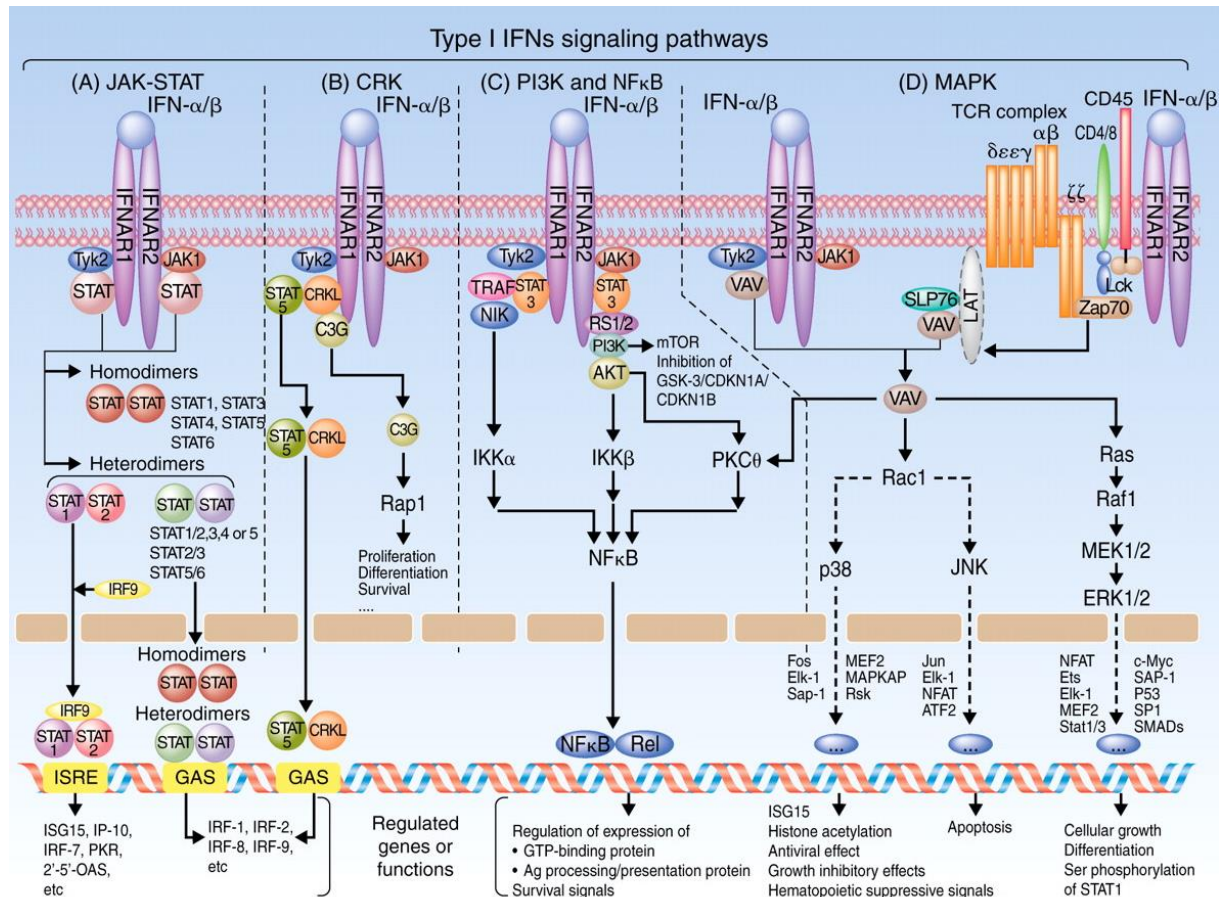


Abb. 1-3 Typ I IFN-induzierte Signalwege - der klassische JAK/STAT-Signalweg und alternative Signalwege.

Neben dem klassischen JAK/STAT-Signalweg (A) kann die Bindung des IFNAR auch diverse andere Signalwege induzieren. Dabei können die Signalkaskaden unabhängig voneinander aktiviert werden oder sich in vielen Schritten bzw. bezüglich der Beteiligung verschiedener Adapter- oder Effektormoleküle überschneiden. Weitere alternative Typ I IFN-induzierte Signalwege sind der CRKL Signalweg (B), der PI3K und NF-κB Signalweg (C) und der MAPK signalweg (D) [85].

1.2.3 Antivirale Eigenschaften von Typ I Interferonen

Durch die Stimulation mit Typ I IFN wird die Expression hunderter ISGs induziert, die sowohl die infizierte Zelle als auch benachbarte Zellen in einen antiviralen Zustand versetzen können.

Zu den wichtigsten direkt antiviral wirkenden ISGs gehören die Proteinkinase R (PKR), die 2,5-Oligoadenlyatsynthetase (OAS) und Myxovirus Resistenzproteine (Mx Proteine).

PKR erkennt doppelsträngige RNA (Ribonukleinsäure, eng. *ribonucleic acid*), bindet sie und kann dadurch den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 α (eIF2 α) aktivieren, der die Translation von Boten RNA (engl. *messenger RNA*; mRNA) inhibiert und somit auch die Synthese viraler und zellulärer Proteine [231]. Außerdem kann die Bindung an den eIF2 α die Apoptose induzieren, sodass virus-infizierte Zellen absterben.

OAS wird ebenfalls durch die Bindung viraler doppelsträngiger RNA aktiviert, wodurch es im Zytoplasma akkumuliert, ein aktives Tetramer bildet und eine Oligomerisierung von ATP (Adenosintriphosphat) zur Folge hat, wodurch letztendlich die RNase L (RNA Nuklease L) aktiviert wird. RNase L kann daraufhin sowohl zelluläre als auch virale RNA degradieren [204].

Mx Proteine sind Guanosintriphosphatasen, die nach Typ I IFN Stimulation im Zytoplasma an intrazellulären Zellmembranen akkumulieren. Nach Bindung des viralen Nukleokapsids oder anderer viraler Bestandteile werden diese Komponenten abgefangen und deren Degradierung eingeleitet [58].

Wichtige antivirale ISGs in retroviralen Infektionen sind zudem TRIM5 α (*tripartite motif 5*) oder TRIM22, APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3G*) und Tetherin. TRIM5 α bzw. TRIM22 binden eingedrungene Retroviren, wodurch sie schnell proteasomal abgebaut werden können, noch bevor sie mit ihrer wichtigen viralen DNA Synthese beginnen [12, 92]. APOBEC3G führt zur Destabilisierung der viralen RNA und induziert Hypermutationen. Tetherin hingegen ist ein Membranprotein und verhindert die Freisetzung von Retroviruspartikeln [154]. Die Expression dieser verschiedenen ISGs kann dazu führen, dass die Replikation der Viren in den infizierten Zellen inhibiert wird.

1.2.4 Immunmodulatorische Eigenschaften von Typ I Interferonen

Neben den direkten antiviralen Eigenschaften, können Typ I IFN sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem modulieren. So kann die Stimulation mit Typ I IFN die Entwicklung von DCs beeinflussen, beginnend mit der Initiierung der Maturierung zu reifen DCs [134, 168]. Außerdem werden durch Typ I IFN die DCs aktiviert, was durch erhöhte Expressionslevels an MHC I und MHC II sowie kostimulatorischer Moleküle, wie CD80 und CD86 charakterisiert ist [148]. Die ebenfalls verstärkte Expression der Chemokinrezeptoren (CCR) 5 und CCR7 führt

zur Migration in anliegende lymphatische Organe, die Typ I IFN-induzierte Expression von Chemokinrezeptor-Liganden (CXCL) 9 und CXCL10 dienen wiederum als Chemoattraktoren für T Zellen [165, 170, 191]. Schließlich verstärken Typ I IFN die Kreuzpräsentation durch DCs, also die Möglichkeit pathogene Strukturen über MHC I zu präsentieren, obwohl die DCs nicht direkt infiziert wurden. Durch die Kreuzpräsentation wird eine weitere Möglichkeit geschaffen, CD8⁺ T Zellen über den MHC I Präsentationsweg zu aktivieren [123]. Darüber hinaus induzieren Typ I IFN die Produktion von Zytokinen wie IL-6, IL-12 und IL-15 in DCs, als auch IL-10 in Makrophagen [85]. All diese Mechanismen beeinflussen die CD8⁺ T Effektor Zellantwort.

Typ I IFN können auch als drittes Signal und somit direkt auf CD8⁺ T Zellen wirken, um sowohl die optimale klonale Expansion von CD8⁺ T Zellen zu induzieren, als auch deren Überleben zu sichern. Die Formatierung einer Gedächtnis CD8⁺ T Zellantwort kann ebenfalls durch Typ I IFN induziert werden [112]. Außerdem werden Typ I IFN benötigt, um die Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen zu steigern. Die Expression von Zytokinen sowie zytotoxischen Molekülen wird hierdurch hochreguliert [9, 35, 142].

Typ I IFN können außerdem auch auf NK Zellen wirken und deren Proliferation, Zytotoxizität und IFN γ Sekretion induzieren [15, 91, 127]. Des Weiteren wird durch Typ I IFN die Antikörperproduktion in B Zellen stimuliert und der Isotypwechsel der Antikörper beeinflusst [122].

Eine Zusammenfassung der antiviralen und immunmodulatorischen Eigenschaften von Typ I IFN ist in Abb. 1-4 gezeigt.

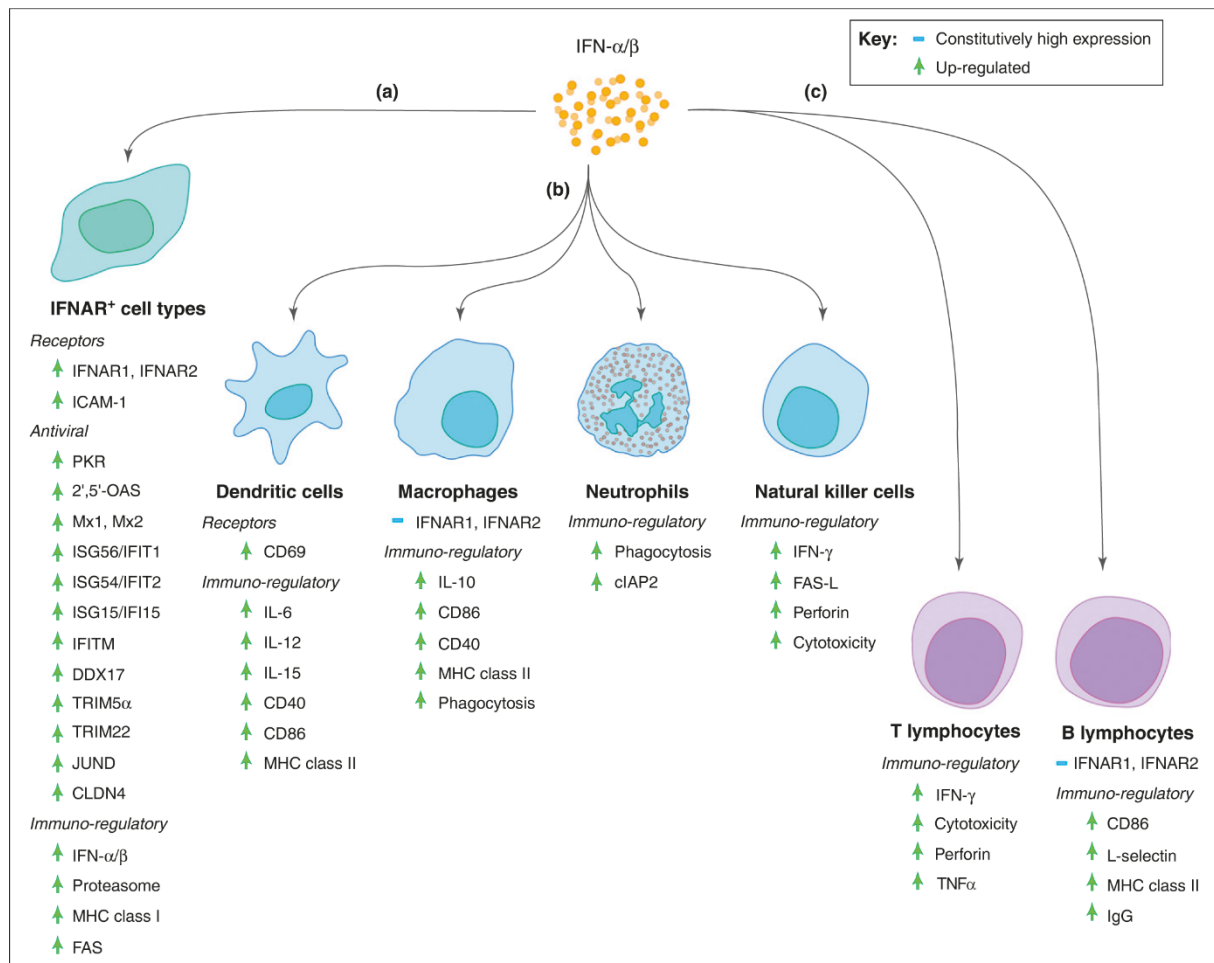


Abb. 1-4 Immunmodulatorische Funktionen von Typ I IFN auf Immunzellen.

Überblick über die immunmodulatorischen Effekte von Typ I IFN auf verschiedene Zellen des Immunsystems (verändert nach [226]).

1.2.5 Antiproliferative Eigenschaften von Typ I Interferonen

Eine der ersten Funktionen, die für Typ I IFN beschrieben wurde, ist der antiproliferative Effekt [130, 179]. Die Inhibierung der Zellteilung und die damit verbundene Unterdrückung der Proteinbiosynthese von infizierten Zellen kann somit die Ausbreitung von Virusinfektionen verhindern. Es ist bekannt, dass Typ I IFN in verschiedenen Phasen des mitotischen Zellzyklus wirken und die meisten Zellen dabei in der G1 Phase arretiert werden [189]. Dabei unterscheiden sich die antiproliferativen Eigenschaften je nach Zelltyp [14]. Darüber hinaus können Typ I IFN aber auch den Zelltod, also die Apoptose in Zellen auslösen, was somit eine wichtige anti-tumorale Eigenschaft ist [73].

1.2.6 Strategien der viralen Immunevasion der Typ I Interferon Antwort

Im Laufe der Evolution haben viele Viren unterschiedliche Strategien entwickelt, um einer Immunantwort zu entgehen, indem sie die Typ I IFN Antwort unterdrücken (Abb. 1-4). Dabei blockieren sie direkt die Expression von Typ I IFN, z.B. indem sie virale homologe Proteine induzieren (Abb. 1-5 A). Außerdem kann die Typ I IFN Signalkaskade blockiert und somit die Induktion weiterer Immunantworten unterdrückt werden (Abb. 1-5 B). Schließlich können auch IFN-induzierte antivirale ISGs und deren Produkte durch Viren inhibiert werden (Abb. 1-5 C) [84].

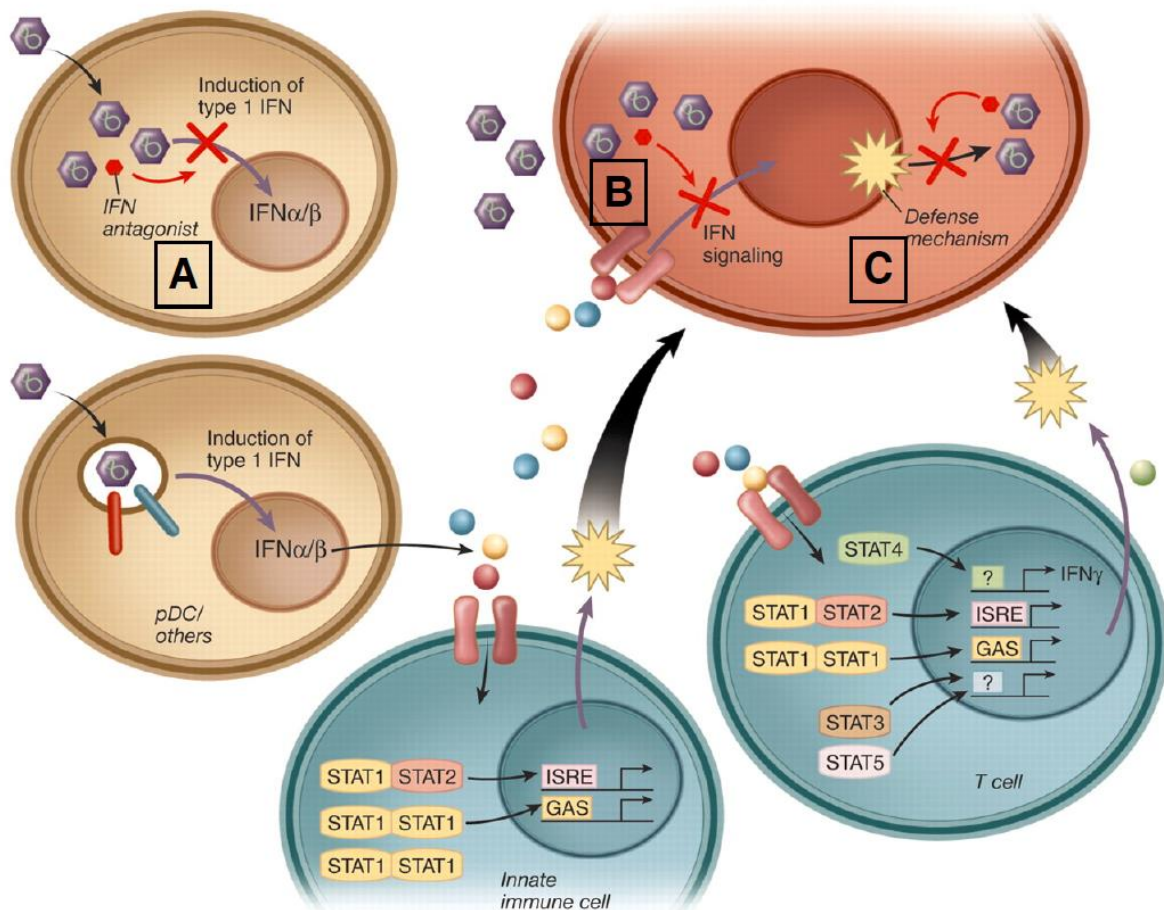


Abb. 1-5 Virale Evasionsstrategien der Typ I IFN Antwort.

Viren haben verschiedene Strategien entwickelt, um die Effekte von Typ I IFN zu inhibieren und damit eine Immunantwort zu unterdrücken. So können Viren direkt die Expression von Typ I IFN hemmen (A), können die Typ I IFN Signalkaskade blockieren (B) oder Typ I IFN-induzierte Gene und deren Produkte inhibieren (verändert nach [58]).

Für das humane Immundefizienzvirus (HIV) ist z.B. bekannt, dass es für einen viralen Antagonisten kodiert, das akzessorische Vpu Protein. Vpu interagiert mit dem

Typ I IFN Signalweg, genauer mit IRF3, und blockiert die darauffolgende Bindung von ISRE, wodurch letztlich die virale Replikation in Abwesenheit von Typ I IFN möglich ist [192]. Vpu inhibiert außerdem den NF- κ B Signalweg und verhindert über diesen Weg die Induktion von Typ I IFN [196].

1.2.7 Therapeutische Nutzung von IFN α

Als IFN 1957 entdeckt und 1979 zum ersten Mal kloniert wurde, dachten viele Virologen ein Allheilmittel gegen Virusinfektionen gefunden zu haben. Fast 40 Jahre später ist die therapeutische Nutzung von IFN auf die Behandlung von Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) beschränkt [57]. Eine Möglichkeit hierfür können die komplexen Effektorfunktionen von Typ I IFN sein, die zudem noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Typ I IFN induzieren hunderte von ISGs, wovon manche eine direkt antivirale Wirkung haben, andere wiederum eine immunmodulierende. Individuelle antivirale Effekte, die durch die Behandlung mit Typ I IFN induziert werden, sind daher schwer von immunmodulatorischen Effekten zu trennen. Mehrere Studien haben versucht den genauen molekularen Mechanismus der IFN Therapie zu identifizieren. Obwohl man herausfand, dass durch die Expression von ISGs die Virusreplikation direkt beeinträchtigt ist, werden die immunmodulatorischen Eigenschaften von Typ I IFN immer noch kontrovers diskutiert [40, 53]. Die IFN Therapie während einer chronischen HBV Infektion führte zu sehr gegensätzlichen Ergebnissen: IFN, zusammen mit einer effektiven Nukleos(t)idinhibitor Behandlung, konnte HBV-spezifische CD4⁺ T Zellen verstärkt aktivieren. Ein Zusammenhang mit einer Heilung konnte jedoch nicht festgestellt werden [210]. Andere Studien haben klar gezeigt, dass IFN keinen Effekt auf T Zellen, allerdings auf NK Zellen, hatte [145, 175].

In weiteren klinischen Studien wurde der therapeutische Effekt von Typ I IFN während einer HIV Erkrankung untersucht. Obwohl zunächst vielversprechende Ergebnisse in kleineren Studien erzielt werden konnten, stellte sich durch große, randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien heraus, dass durch die Typ I IFN Monotherapie kein signifikanter Erfolg erzielt werden konnte [4, 19, 108].

Eine Typ I IFN Therapie kann darüber hinaus mit einer Vielzahl an Nebenwirkungen einhergehen. Die am häufigsten beobachtete Begleiterscheinung sind grippeähnliche Symptome wie Fieber und Muskelschmerzen, die durch die Immunantwort ausgelöst

werden können. Zusätzlich kann eine Typ I IFN Therapie neuropsychiatrische Nebenwirkungen auslösen, wie Depressionen, Antriebslosigkeit und kognitive Defizite [206]. Durch die immunmodulatorischen Eigenschaften von Typ I IFN können zudem vorbestehende, oder neue autoimmune Dysfunktionen verstärkt bzw. neu induziert werden [28].

1.2.8 Rolle von verschiedenen IFN α Subtypen

Wie bereits erwähnt zählen zu den Typ I IFN viele verschiedene IFN α Subtypen. Obwohl IFN α Subtypen hoch konservierte Proteine sind (75 - 99 % Aminosäure-identität) und alle den gleichen Rezeptor binden, sind sie nicht redundant und besitzen unterschiedliche biologische Funktionen [64, 75, 246]. Welcher Mechanismus sich dahinter verbirgt, ist bisher weitestgehend ungeklärt. Ein möglicher Grund dafür könnten allerdings die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der einzelnen IFN α Subtypen zu den zwei Rezeptoruntereinheiten sein. So wurde z.B. gezeigt, dass die Bindungsaffinität mit der antiproliferativen Eigenschaft eines jeden Subtyps korreliert, was jedoch nicht der Fall bezogen auf die antiviralen oder immunmodulatorischen Eigenschaften der IFN α Subtypen ist [121]. Eine zusätzliche Möglichkeit, warum IFN α Subtypen unterschiedliche ISG Muster induzieren, könnte die Aktivierung verschiedener Signalwege sein [32]. Außerdem hat man Unterschiede zwischen der biologischen Funktion einzelner IFN α Subtypen festgestellt, abhängig davon, welcher Zelltyp stimuliert wird [147]. So konnte gezeigt werden, dass nur die Stimulation mit einigen IFN α Subtypen die Expression des IFN-induzierten Proteins-10 (IP-10) in DCs hochreguliert, ein Chemokin, welches eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von T Zellen spielt. Im Gegensatz dazu induzierte kein einziger IFN α Subtyp IP-10 in T Zellen [88]. Zusätzlich ist der Virustyp, der eine Zelle infiziert, wichtig für die Expressionsmuster von IFN α Subtypen, aber auch die antivirale Wirksamkeit gegenüber Virusinfektionen ist Subtyp-spezifisch [8, 66, 129]. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass ein komplexer Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit der einzelnen IFN α Subtypen und den vielen Mechanismen besteht, die durch ein Zusammenspiel diverser Faktoren beeinflusst werden. Allerdings stellt die Therapie mit unterschiedlichen IFN α Subtypen eine Möglichkeit dar, Viruserkrankungen effektiv, hochspezifisch und möglicherweise mit weniger Nebenwirkungen zu behandeln.

1.3 Retroviren

Retroviren wurden vor mehr als 100 Jahren das erste Mal beschrieben, als Ellermann und Bang 1908 eine Leukämie durch Ultrafiltrate von kranken auf gesunde Hühner übertragen konnten. Heute kennt man verschiedenste Retroviren, die sowohl den Menschen (z.B. humanes T-lymphotropes Virus 1; HTLV-1), aber auch andere Säugetiere infizieren können, darunter das murine Friend Leukämievirus (engl. *Friend murine leukemia virus*; F-MuLV) bei Mäusen [55], das Simiane Immundefizienzvirus (engl. *Simian immunodeficiency virus*; SIV) bei Schimpansen oder Rhesusmakaken [126, 220] oder das Feline Immundefizienzvirus (engl. *Feline immunodeficiency virus*; FIV) bei Katzen [78]. Das wohl bekannteste Retrovirus, was den Menschen infiziert, ist HIV, welches bei Ausbruch der Krankheit das erworbene Immunschwächesyndrom (engl. *acquired immunodeficiency syndrom*; AIDS) auslösen kann. Heute sind 36,7 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert (*World Health Organization UNAIDS*, Stand: 2016), weshalb es von großem Interesse ist, an Therapie- und Heilungsmöglichkeiten, aber auch Impfstoffen gegen HIV zu forschen.

1.3.1 Aufbau von Retroviren

Retroviren sind umhüllte RNA Viren, die ein lineares einzelsträngiges Genom mit positiver Polarität und einer Größe von 7 - 12 kB besitzen. Das Besondere an der Familie der Retroviren ist der Besitz einer reversen Transkriptase. Hiermit sind Retroviren in der Lage, ihre eingeschleuste virale RNA in doppelsträngige DNA umzuschreiben und diese ins humane Genom zu integrieren. Die Größe der Virionen beträgt etwa 80 - 100 nm. Die Hülle besteht aus einer Doppellipidschicht und enthält virale Glykoproteine, die eine wichtige Rolle für die Rezeptorbindung und die daraus resultierende Infektion von Wirtszellen spielen. Auf der Innenseite der Hüllmembran befinden sich Matrixproteine, die wiederum das Nucleokapsid umgeben. Dieses Nucleokapsid beinhaltet die diploiden Einzelstrang RNA Moleküle, die reverse Transkriptase, sowie die Integrase und weitere Proteine (Abb. 1-6).

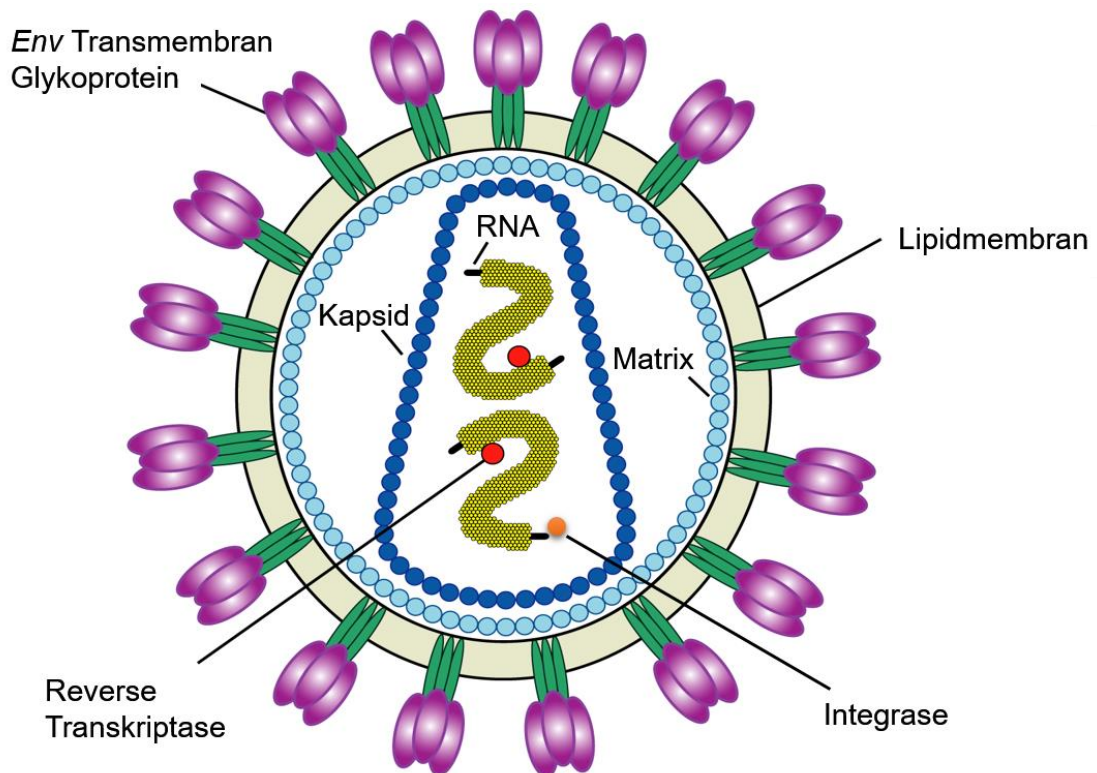


Abb. 1-6 Schematischer Aufbau von Retroviren.

Retroviren besitzen eine Virushülle mit transmembranen viralen Glykoproteinen. Im Inneren des Virion befindet sich ein Viruskapsid, welches die virale einzelsträngige RNA beinhaltet, sowie für die Virusreplikation wichtigen Enzyme (Reverse Transkriptase, Integrase), sowie weitere Proteine (Abb. Verändert nach [159].)

Die Genome aller infektiösen Retroviren enthalten die drei Hauptgene *Gag* (gruppenspezifische Antigene), *Env* (*envelope*, Glykoproteine) und *Pol* (*polymerase*, enzymatische Aktivität wie reverse Transkriptase, Integrase, Protease). Komplexere Retroviren, wie HIV, besitzen zudem Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren.

1.3.2 Replikationszyklus von Retroviren

Der Replikationszyklus von Retroviren lässt sich in mehrere Schritte einteilen (Abb. 1-7). Zunächst bindet das Virus über sein Retrovirus-spezifisches Transmembran Glykoprotein an einen dafür spezifischen Rezeptor der Wirtszelle ①. Dadurch fusionieren die virale und die Wirtszellmembran ② und es entsteht eine Pore, durch die das virale Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen kann (sog. *Uncoating*) ③. Anschließend löst sich das Kapsid auf, wodurch die virale RNA und

die verschiedenen viralen Proteine (z.B. Reverse Transkriptase und Integrase) freigesetzt werden. Nun kann die reverse Transkription beginnen und die virale einzelsträngige RNA wird in doppelsträngige DNA umgeschrieben ④. Dabei besitzt die reverse Transkriptase zwei enzymatische Aktivitäten, die relevant sind für die reverse Transkription. Zum einen besitzt sie eine DNA Polymerase Aktivität, d.h. sie kann RNA zu DNA umschreiben. Zum anderen besitzt sie eine RNase H Aktivität, wodurch die RNA des RNA-DNA-Duplex degradiert werden kann. Der so entstandene DNA Einzelstrang dient somit als Vorlage für die Synthese des zweiten DNA Strangs. Zusammen mit der viralen DNA, der Integrase und weiteren zellulären Proteinen entsteht der sog. Präintegrationskomplex (PIC), der in den Zellkern transportiert wird ⑤. Die Integration der viralen DNA kann theoretisch an jeder Stelle des Wirtszellgenoms erfolgen, es gibt jedoch Loci, die abhängig vom Retrovirus bevorzugt werden. Die Integration wird durch die Integrase katalysiert ⑥, welche wie die reverse Transkriptase, verschiedene enzymatische Aktivitäten besitzt. Zunächst entfernt sie zwei Nukleotide am 3'-Ende der viralen DNA, sodass 5'-Überhänge entstehen, zum anderen spaltet die Integrase die Wirtszell-DNA auf, sodass die Integration ermöglicht wird. Durch DNA Reparaturenzyme der Wirtszelle werden die Lücken in der DNA geschlossen. Das so gebildete Provirus wird nun, wie die Wirtszell-DNA, mit Hilfe der RNA-Polymerase II und anderen Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle, transkribiert ⑦. Die so entstandene virale mRNA wird in das Zytoplasma exportiert, wo die Translation der viralen Proteine stattfindet ⑧. Die Synthese der Transmembran Glykoproteine findet an der Membran des endoplasmatischen Retikulums statt, damit die so entstandenen Proteine über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert werden können. Die Translation aller anderen viralen Proteine findet an den Ribosomen statt. An der Zellmembran werden anschließend neue Viruspartikel verpackt ⑨. Der Zusammenbau neuer Viruspartikel wird hauptsächlich durch Gag katalysiert. Die neuen Viruspartikel enthalten zwei Kopien viraler einzelsträngiger RNA, die viralen Enzyme, aber auch Proteine der Wirtszelle ⑩. Bei Kontakt mit der viralen einzelsträngigen RNA stülpt sich die Zellmembran an der Oberfläche ein (*Budding*) und schnürt neue Viruspartikel ab ⑪. Die Transmembran Glykoproteine, die zuvor an die Zelloberfläche transportiert worden sind, werden somit in das neue Viruspartikel mit eingebaut. Schließlich folgt die Freisetzung der noch unreifen Viruspartikel ⑫. Die Entwicklung zu reifen

Virionen beginnt gleichzeitig mit dem Budding. Dabei spaltet die virale Protease die Gag und Gag/Pol Polyproteine an verschiedenen Stellen, sodass sowohl Matrixproteine, als auch Kapsid- und Nukleokapsidproteine entstehen (13). Durch diese strukturellen Veränderungen entstehen infektiöse Retroviren mit ihrem charakteristischen kegelförmigen Kern [160].

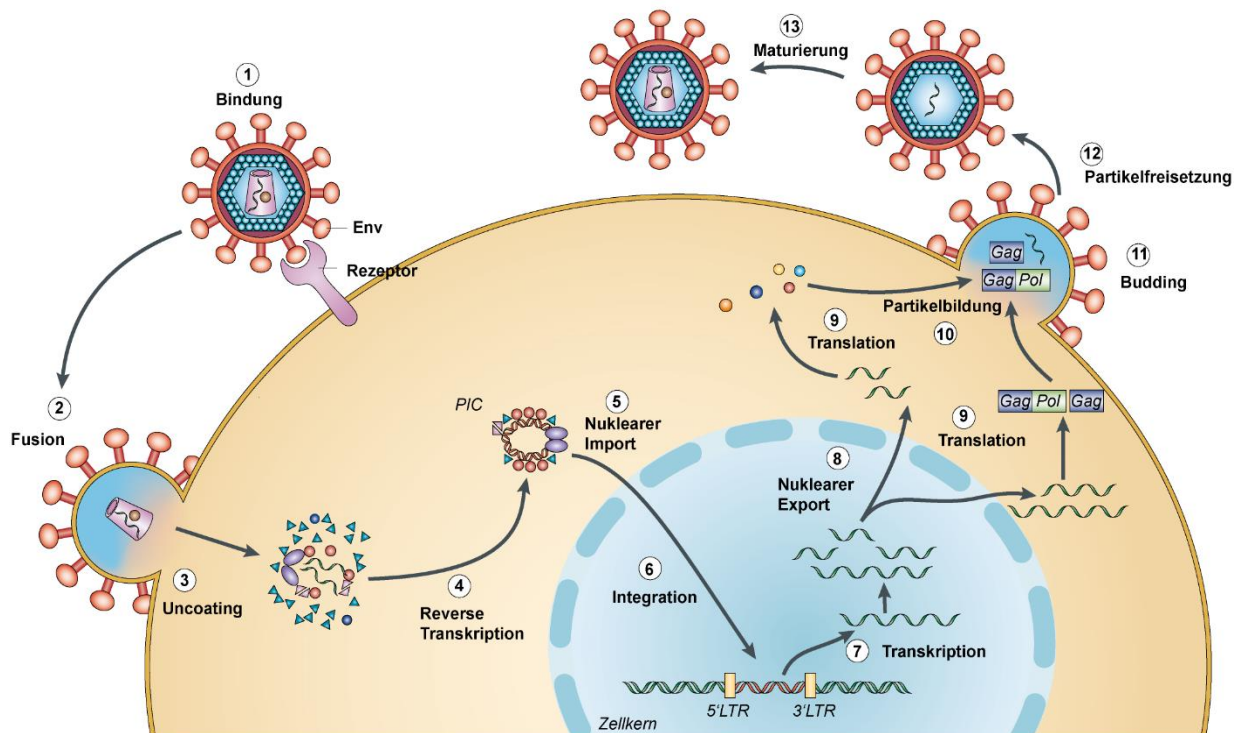


Abb. 1-7 Replikationszyklus von Retroviren.

Die wesentlichen Schritte der Replikation von Retroviren sind: ① Die Bindung des Virus an die Wirtszelle, ② die Fusionierung des Virus mit der Wirtszellmembran, ③ das Entpacken des Virus, ④ die reverse Transkription der viralen einzelsträngigen RNA zu doppelsträngiger DNA, ⑤ der Import des Präintegrationskomplexes in den Zellkern, ⑥ die Integration der viralen DNA in das Wirtszellgenom, ⑦ die Transkription der DNA zu mRNA, ⑧ der Export der viralen mRNA, ⑨ die Translation der viralen Proteine, ⑩ das Verpacken neuer Viruspartikel, ⑪ das Abschnüren neuer Viruspartikel, ⑫ die Freisetzung neuer Viruspartikel und schließlich die ⑬ Reifung zu neuen Virionen (Abb. Verändert nach [50]).

1.3.3 Das Friend Retrovirus

Nach der Entdeckung von HIV im Jahre 1983 begannen sofort die ersten Forschungsstudien zur Entwicklung von Therapiemöglichkeiten und einem geeigneten Impfstoff. Bisher vermittelt keiner der bis heute entwickelten Vakzine einen ausreichenden Schutz vor dem Virus. Zu der zurzeit einzig wirksamen antiretroviralen Therapie, der sog. ART (engl. *Antiretroviral Therapy*), haben heute

ca. 53 % der HIV-Infizierten Zugang. Das sind deutlich mehr Patienten als noch vor 10 Jahren, als der Anteil bei unter 10 % lag (*World Health Organization UNAIDS*, Stand: 2016). Trotzdem ist eine Heilung bisher nicht möglich, weshalb die Forschung an HIV immer noch im Fokus der Wissenschaft steht.

Es gibt heutzutage verschiedene Tiermodelle, die die Forschung mit Retroviren ermöglicht. Neben dem Menschen infiziert HIV ausschließlich Schimpansen, wobei das Virus hier nur schlecht repliziert und sich eine AIDS-ähnliche Erkrankung nur selten entwickelt [161, 162]. Allerdings können Schimpansen oder auch Rhesusmakaken mit SIV infiziert werden. Experimente mit Affen sind jedoch mit hohen Kosten verbunden und darüber hinaus ethisch sehr umstritten. Der genetische Hintergrund der Affen in diesen Tiermodellen ist außerdem sehr heterolog und das Immunsystem lässt sich kaum manipulieren. Daher sind Tierexperimente mit Mäusen leichter zu realisieren. Sie sind leicht in der Haltung und im Umgang und der genetische Hintergrund lässt sich genau definieren, was die Nutzung von transgenen oder *Knockout*-Mäusen ermöglicht.

Seit einiger Zeit ist die Nutzung von humanisierten Mäusen ein neuer Fortschritt im Hinblick auf die Erforschung des humanen Immunsystems und damit verbundener Krankheiten. Das erfolgreichste Modell für die Erforschung von HIV ist das BLT (Knochenmark, Leber, Thymus; engl. *bone marrow, liver, thymus*) Modell. Nach Ganzkörperbestrahlung erhalten immundefiziente Mäuse Transplantate von humanen fötalen Gewebefragmenten der Leber, des Thymus und der Nierenkapsel. Hieraus entwickeln sich organähnliche Strukturen. Durch eine zusätzliche Injektion mit CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen desselben Spenders, die als Vorläuferzellen dienen, entwickeln sich humane Lymphozyten [106, 202]. Eine häufige Komplikation während der Generierung von humanisierten Mäusen ist die Reaktion des Transplantats gegen den Wirt (engl. *graft-versus-host disease*). Es hat sich herausgestellt, dass der zusätzliche Knockout von CD47 dazu beiträgt, dieser Reaktion zu entgehen. Diese sog. C57BL/6 Rag2^{-/-}γc^{-/-}CD47^{-/-} Mäuse lassen sich daher für chronische Infektionsexperimente verwenden und können somit effizient mit HIV infiziert werden und entwickeln Virus-spezifische T und B Zellantworten [120]. Die Nachteile dieses Tiermodells sind dennoch die hohen Kosten, der große Zeitaufwand für die Generation der Mäuse und ethische Aspekte.

Ein mausspezifisches Retrovirus ist das onkogene FV, welches sich aus zwei Viren zusammensetzt. Dieser Komplex besteht aus dem pathogenen, aber replikations-

inkompetenten *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV) und dem apathogenen, aber replikationskompetenten F-MuLV. Im Gegensatz zu HIV hat die FV Infektion einen abweichenden Krankheitsverlauf, weshalb das FV Modell für pathologische Fragestellungen nicht verwendet werden kann. Allerdings gibt es große Übereinstimmungen bezüglich der Immunantwort zwischen einer Infektion mit dem FV und SIV oder HIV [44]. Immunologische Aspekte in Bezug auf eine Retrovirusinfektion lassen sich daher mit dem FV Model gut untersuchen. Hier wurde das FV Modell verwendet, um die Immuntherapie mit verschiedenen IFN α Subtypen und daran beteiligte Immunzellpopulationen genauer zu untersuchen.

1.3.3.1 Immunantwort während einer Friend Virus Infektion

Je nach Mausstamm und entsprechendem genetischem Hintergrund (Resistenzgene), verläuft die FV Infektion unterschiedlich. Der in dieser Arbeit verwendete Mausstamm C57BL/6 ist aufgrund seines H-2^b Haplotyps und Resistenzgens Fv-2 immun gegen eine FV-induzierte Vergrößerung der Milz (Splénomegalie) und Erythroleukämie. C57BL/6 Mäuse entwickeln nach der Infektion mit dem FV eine effiziente FV-spezifische Immunantwort. Diese ermöglicht es zwar das FV zu kontrollieren, es persistiert aber lebenslang (vergleichbar wie die Infektion mit SIV oder HIV). Die Entwicklung einer AIDS-ähnlichen Erkrankung der Mäuse bleibt allerdings aus.

Nach Infektion mit dem FV werden in der frühen Phase der Infektion NK Zellen aktiviert, die die Virusreplikation anhand der starken Expression von TRAIL, GzmB und Perforin inhibieren [132]. Danach expandieren die CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen [81]. CD4⁺ T Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Effektor CD8⁺ T Zellen und B Zellen. Fehlen CD4⁺ T Zellen in der akuten Infektion, so ist ein starker Anstieg der Viruslast detektierbar [79, 186]. Die Effektor CD8⁺ T Zellantwort ist direkt gegen FV-infizierte Zellen gerichtet. Durch die Expression von Virus-spezifischen Peptiden auf der Oberfläche von infizierten Zellen, können diese von CD8⁺ T Zellen erkannt und mit Hilfe der zytotoxischen Moleküle Perforin, GzmA und GzmB eliminiert werden [240]. Eine effektive CD8⁺ T Zellantwort in der akuten Phase der Infektion ist ebenfalls für die Viruseliminierung von großer Bedeutung. Depletiert man CD8⁺ T Zellen zu diesem Zeitpunkt, so steigt auch hier die Viruslast dramatisch an [79, 186]. Im Gegensatz dazu hat die Depletion von CD8⁺ T Zellen in der chronischen Phase der Infektion keine Auswirkungen auf die Viruslast [80]. In der persistierenden

Phase spielen CD4⁺ T Zellen die zentrale Rolle, um die Viruslast zu kontrollieren. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass zytotoxische CD4⁺ T Zellen während der chronischen Infektion dafür verantwortlich sind, FV-infizierte Zellen über den Fas-FasL-Weg zu eliminieren [138]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FV-spezifische CD8⁺ T Zellen in der chronischen Phase der Infektion ihre Effektorfunktionen verlieren (Expression von Perforin, GzmA, GzmB und IFN γ), inhibitorische Moleküle stärker exprimiert werden und dass dies mit der Expansion von regulatorischen CD4⁺ T Zellen korrelierte [45]. Heute weiß man, dass diese virus-unspezifischen regulatorischen CD4⁺ T Zellen in der akuten Phase der FV Infektion sowohl von CD8⁺ T Zellen als auch von B Zellen induziert werden [42, 149]. Darüber hinaus supprimieren regulatorische CD4⁺ T Zellen die NK Zellantwort, indem sie große Mengen an IL-2 konsumieren, welches für die NK Zellaktivierung folglich nicht mehr zur Verfügung steht [131]. Die Tatsache, dass regulatorische CD4⁺ T Zellen die FV Immunantwort supprimieren und CD8⁺ T Zellen somit dysfunktional werden führt letztendlich dazu, dass virusinfizierte Zellen nicht vollständig eliminiert werden und die Infektion persistiert.

Effekt der IFN α Subtyp Behandlung während der Friend Virus Infektion

In der akuten Phase der FV Infektion ist kein IFN α Protein im Plasma von Mäusen detektierbar [62]. Allerdings konnte in Milzzellen gezeigt werden, dass die mRNA Expression einzelner IFN α Subtypen, nämlich *IFNA4* und *IFNA9* induziert wurde, nicht aber von den Subtypen *IFNA1* oder *IFNA6* [61]. Daher wurde das FV Model bereits genutzt, um die antiviralen Effekte verschiedener IFN α Subtypen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen. Durch Behandlung mit rekombinanten IFN α Proteinen konnte mit allen getesteten IFN α Subtypen, außer IFN α 2, die FV Replikation *in vitro* supprimiert werden. Im Gegensatz dazu wichen die *in vivo* beobachteten antiviralen Effekte der jeweiligen Subtypen zum Teil stark von den *in vitro* Ergebnissen ab [61, 65]. Hier wurde gezeigt, dass die Behandlung von akut FV-infizierten Mäusen ausschließlich mit den Subtypen IFN α 1, IFN α 4, IFN α 9 und IFN α 11 zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast führen konnte. IFN α 2, IFN α 5 und IFN α 6 hatten hingegen keinen Effekt. Außerdem führte die Behandlung mit IFN α 1 zu einer erhöhten Anzahl an FV-spezifischen CD8⁺ T Zellen, wohingegen IFN α 11 vor allem die NK Zellantwort verbesserte, was jeweils mit einer verminderten Viruslast einherging [61, 65]. FV-infizierte Mäuse, die mit dem synthetischen TLR3

Liganden Poly-Inosin-Poly-Cytidyl-Säure (Poly (I:C)) behandelt wurden, induzierten eine gesteigerte Typ I IFN Antwort, was schließlich zu verbesserten CD8⁺ T Zellantworten führte und ebenfalls zu einer Abnahme der Viruslast [63].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Ausschüttung von IFN α ist der erste Abwehrmechanismus eines Organismus, um eingedrungene Viren zu bekämpfen. Dabei wird die biologische Rolle von verschiedenen IFN α Subtypen und die Frage nach ihrer unterschiedlichen Funktionalität immer noch diskutiert. Die Induktion der individuellen IFN α Subtypen hängt von dem infizierenden Virus ab. Darunter müssen sich jedoch nicht zwangsläufig diejenigen befinden, die den größten antiviralen Effekt gegen die jeweilige Virusinfektion vermitteln. Denn viele Viren haben Mechanismen entwickelt, um einer IFN Antwort zu entgehen. Daher stellt die exogene therapeutische Gabe von verschiedenen IFN α Subtypen ein potentes Mittel dar, um Virusinfektionen zu behandeln. Bis heute wird ausschließlich IFN α 2 und kein anderer IFN α Subtyp für die Behandlung von Viruserkrankungen in der Klinik verwendet. Kontrovers wird der spezifische Effekt der IFN α Therapie auf die Modulation von T Zellantworten diskutiert. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche immunmodulatorische Wirkung die verschiedenen IFN α Subtypen auf CD8⁺ T Zellen haben. Hierfür wurde das FV Mausmodell verwendet, um den Effekt der unterschiedlichen IFN α Subtypen auf Virus-spezifische CD8⁺ T Zellantworten in einem hoch standardisierten *in vitro* Proliferationstest zu untersuchen. Dabei sollte die Wirkung auf die Proliferation sowie die Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen analysiert werden. Mit einem Zytotoxizitätstest sollte auch die spezifische Eliminierung von Zielzellen *in vitro* und *in vivo* gemessen werden. Des Weiteren sollte die Wirkung der IFN α Subtypen auf DCs untersucht werden, da diese Zellen wesentlich an der CD8⁺ T Zellaktivierung beteiligt sind. In *in vivo* Experimenten sollte die Modulation von CD8⁺ T Zellen während der therapeutischen Behandlung von akut oder chronisch FV-infizierten Mäusen mit verschiedenen IFN α Subtypen untersucht werden.

2 Material

2.1 Geräte

Tab. 2-1 Geräte

Produkt	Hersteller
-80 °C Gefrierschrank MDF-U73V	Sanyo, München
Auflichtmikroskop CK2	Hund, Wetzlar
Auflichtmikroskop LabA1 AX10	Zeiss, Oberkochen
Automatische Multipipette Voyager 2	Integra Biosciences, Konstanz
BioSpectrometer® basic	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ Brutschrank CO ₂ Incubator	Sanyo, München
CO ₂ Brutschrank Galaxy 48R	New Brunswick/Eppendorf, Hamburg
Durchflusszytometer FACSCanto™ II (<i>Fluorescence activated cell sorting</i> , FACS)	BD, Heidelberg
Elektrophoresesystem	Biorad, Düsseldorf
Entwicklungsmaschine Cawomat 2000 IR	CAWO, Schrobenehausen
Heizmischer Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inverses Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Kühlgefrierkombination Comfort	Liebherr, Ochsenhausen
Manuelle Pipetten (2,10,20,200,1000µl)	StarLab, Ahrensberg
Multipette AutoRep E	Rainin, Mettler Toledo, Gießen
Multiplatten-Luminometer GloMax®-Multi Detection System	Promega, Mannheim
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim/Rhön
Orbitalschüttler PS-M3D	Grant Instruments, Cambridge, UK
PCR (Polymerasekettenreaktion) System StepOne	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PCR Werkbank AirClean 600	StarLab, Ahrensberg
pH-Meter inoLab® pH 7110	WTW GmbH, Weilheim
Photometer Multiskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pipettierhilfe Ergo One Fast	StarLab, Ahrensberg

QuadroMACS® Separator	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Sicherheitswerkbank 2-447 C	Köttermann Systemlabor, Uetze
Sicherheitswerkbank HeraSafe™	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tube Roller	Starlab, Hamburg
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Biorad, München
Vortexmischer Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen
Waage Scout Pro	Ohaus, Kirchheim
Wärmelampe	Philips, Amsterdam
Wasserheizbad GFL	Oehmen Labortechnik, Essen
Werkbank Hera Save	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-26Xpi	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Sorvall RC6Plus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.2 Verbrauchsmaterial

Tab. 2-2 Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Bechergläser (50, 100, 200ml)	Schott, Mainz
Einmalspritzen, steril (1 ml, 2 ml)	B. Braun, Melsungen
Einweg Skalpelle	Servoprax Mediware, Wesel
Erlenmeyerkolben, (100, 200ml)	Schott, Mainz
FACS Röhrchen	BD, Heidelberg
Filterpapier (Western Blot)	Biorad, Düsseldorf
G25-Kanüle, steril	BD, Heidelberg
Handschuhe Vasco Nitril	B. Braun, Melsungen
Kryotubes, 2ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
Leucosep®-Zentrifugationsröhrchen, 50ml	Greiner Bio One, Frickenhausen
LucentBlue Röntgenfilm	Advansta, Menlo Park (USA)
MACS Säulen (LS)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
<i>MicroAmp® Fast Optical 48-Well Plate</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>MicroAmp® Optical Adhesive Film</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Mikroreaktionsgefäß, steril (0,5, 1,5, 2ml)	Eppendorf, Hamburg

Mikro-Schraubverschlussröhrchen, steril, 1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Nitrozellulosemembran (7 x 8.5 cm)	Biorad, Düsseldorf
Nunc Maxisorp Flachbodenplatten (96- Well)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Pinzetten, chirurgisch	B. Braun, Melsungen
Pipetten, steril (5, 10 & 25ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, steril & unsteril (10/20, 200, 300 & 1000µl)	StarLab, Ahrensberg
Pipettenspitzen, steril 300µl	Integra Biosciences, Konstanz
PP-Rundbodenröhrchen, 5ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Schraubverschlussröhrchen, steril (15, 50ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen
PS-Rundbodenröhrchen, 5ml, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Reagentien-Reservoir, steril (25, 100ml)	Integra Biosciences, Konstanz
Reaktionsgefäß (0,5, 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reservoiraufsätze für Multipette, steril (2,5; 5; 10; 50ml)	Eppendorf, Hamburg
Scheren, spitz	B. Braun, Melsungen
U-Boden Platte, steril, 96 Loch	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturflasche, steril (T25, T75, T175)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, steril, (6, 12, 24, 48 Loch)	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellkulturplatte, steril, 96 Loch	Corning Falcon™, Wiesbaden
Zellkulturplatte, weiß, 96 Loch, optisch	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zellsiebe	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen

2.3 Chemikalien und Nährmedien

Tab. 2-3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-Amino 4-Ethylencarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD, Heidelberg
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology (CST), Cambridge
Cell Trace™ violet (VT)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
DMEM Medium	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Applichem, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Applichem, Darmstadt
FACS Clean	BD, Heidelberg
FACS Flow	BD, Heidelberg
FACS Rinse	BD, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lipopolysaccharide (LPS)	Invivogen, San Diego (USA)
HEPES	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
IFN α 2 (rekombinant)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
IFN α 4 (rekombinant)	PBL Assay Science, New Jersey (USA)
IFN α 11 (rekombinant)	PBL Assay Science, New Jersey (USA)
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Penicillin Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	CST, Cambridge
Poly (I:C)	Invivogen, San Diego (USA)

Ponceau S (rot)	Applichem, Darmstadt
Proteinstandard	Serva, Heidelberg
RNA Shield	Zymo Research, Freiburg
RPMI Medium	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
TMB Substrat (Tetramethylbenzidin)	BioLegend, San Diego (USA)
TRI- <i>Reagent</i> ®	Zymo Research, Freiburg
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Tween-20	Applichem, Darmstadt
Universales IFN α	PBL Assay Science, New Jersey (USA)

2.4 Kommerzielle Standardkits

Tab. 2-4 Kommerzielle Standardkits

Chemikalie	Hersteller
2X PCR Super Master Mix	Bimake, Houston (USA)
All-in-One® cDNA Synthesis Supermix	Bimake, Houston (USA)
DC™ Protein Assay	Biorad, Düsseldorf
Direct-Zol™-RNA Miniprep	Zymo Research, Freiburg
Fixierungspuffer	BioLegend, San Diego (USA)
LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel (13-plex)	BioLegend, San Diego (USA)
Mouse IL-6 ELISA (engl. <i>enzyme-linked Immunosorbent assay</i>) MAX™ Standard	BioLegend, San Diego (USA)
Mouse IL-10 ELISA MAX™ Standard	BioLegend, San Diego (USA)
Mouse IL-12 (p70) ELISA MAX™ Deluxe	BioLegend, San Diego (USA)
PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array Kit	CST, Cambridge (UK)
Percoll Solution	GE Healthcare GmbH, Freiburg

PowerUp™ SYBR® Green MasterMix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PrimeFlow RNA™ Assay	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SignalFire™ ECL Reagent	CST, Cambridge (Großbritannien)
Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini Nitrocellulose Transfer Kit	Biorad, Düsseldorf
<i>True Nuclear</i> Fixierungspuffer	BioLegend, San Diego (USA)
ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research, Freiburg

2.5 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tab. 2-5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
AEC Gebrauchslösung	AEC-Stock-Lösung wurde 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 30 % H ₂ O ₂ /ml Lösung (1:2000) gestartet
AEC-Stocklösung (4 mg/ml)	20 AEC-Tabletten in 100 ml N-N-Dimethylformamid gelöst
ACK Puffer	150 mM Ammoniumchlorid 10 mM Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM Dinatrium-EDTA
Blockierungs-Puffer	1 x TBS-T 5 % Magermilchpulver
Bouin´s Lösung	75 ml gesättigte Pikrinsäure 25 ml 40 % neutrales Formalin 5 ml Essigsäure
DC Medium	RPMI 1640 10 % FCS

	0,5 % Penicillin/Streptomycin 2 mM Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 50 µM β-Mercaptoethanol 1 ng/ml murines rekombinantes (mr) IL4 5 ng/ml mrGM-CSF (Beide Zytokine sind aus Zellkulturüberständen gewonnen)
Einfriermedium	20 ml FCS 10 ml Dimethylsulfoxid 20 ml RPMI 1640
ELISA-Beschichtungspuffer	0,2 M Natriumcarbonat, pH 9,6
FACS Puffer	PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) 0,1 % BSA 0,02 % Natriumazid
HBS (2x)	12 mM Dextrose-H ₂ O 1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat 50 mM HEPES, pH 7,05 10 mM Kalziumchlorid 280 mM Natriumchlorid Σ 500 ml H ₂ O dest., pH 7,05
Lämmli-Puffer (5x)	300 mM TRIS/HCl pH 6,8 25 % Glycerol 10 % SDS 0,005 % Bromphenolblau 4 % β-Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese (10x)	0,25 M TRIS 1,9 M Glycin
Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese (1x)	100 ml Laufpuffer (10x) 10 ml 10% SDS Ad 1 l mit H ₂ O dest.

MACS Puffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA Σ 1 l PBS
Medium für <i>Mus dunni</i> Zellen	RPMI 1640 10 % FCS 0,5 % Penicillin/Streptomycin
Medium für Mx/Rage 7 Zellen	DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 50 µM β-Mercaptoethanol
PBBS (10 x)	1 l PBS 1 g Glukose
TBS (10x)	1,5 M natriumchlorid 0,5 M TRIS pH 7,6
TBS-T (1x)	1 x TBS 0,1 % Tween 20 Ad 1 l mit H ₂ O dest.

2.6 Tetramere und Peptide

Tab. 2-6 Tetramere und Peptide

Bezeichnung	Sequenz/Bemerkung
HA Peptid	HA 512-520: YQILAIYSTVASSLVLL [150]
Ova Peptid	Ova 257-264: SIINFEKL [190]
FV GagL Peptid (Abu Peptid)	GagL 85-93: CCLCLTVFL [128]
MHC I Tetramer	PE markierte MHC Klasse I H2-Db Tetramere spezifisch für FV GagL Peptid (Db-GagL tetramere) [5]

2.7 Antikörper

2.7.1 Antikörper für Durchflusszytometrie

Die Antikörper (AK) wurden von Becton Dickinson, R&D, BioLegend oder Thermo Scientific bezogen.

Tab. 2-7 Antikörper für Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Klon
CD3-PerCP; monoklonaler Hamster-anti-Maus AK	145-2C11
CD8-AlexaFluor700; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	53-6.7
CD8-PE; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	53-6.7
CD11b-AlexaFluor488; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	M1/70
CD11c-PE/Dazzle™ 594, monoklonaler Hamster-anti-Maus AK	N418
CD43-PerCP; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	1B11
CD62L-PE/Cy7; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	MEL-14
CD80-PE-Cy7; monoklonaler Hamster-anti-Maus AK	16-10A1
CD86-BV510; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	GL-1
Eomes-PerCP-eFluor 710; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	Dan11mag
Foxp3-BV421; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	MF-14
GzmB-AlexaFluor700; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	GB11
IFN γ -FITC; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	AN18.17.2
	XMG1.2
IgG2b-PE; monoklonaler Ziege-anti-Maus AK	Poly4053
IL-2-PE/Cy7; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	JES6-5H4
IL-6-PE; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	MP5-20F3
Ki67-PE-eFluor610; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	SoIA15
MHC II-PE; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	M5/114.15.2
PD-1-BV421; monoklonaler Hamster-anti-Maus AK	J43
TNF α -BV510; monoklonaler Ratte-anti-Maus AK	MP6-XT22
TNFR II-APC; monoklonaler Hamster-anti-Maus AK	TR7554

2.7.2 Antikörper für Western Blot

Die Antikörper (AK) wurden von CST, Millipore oder Thermo Scientific bezogen.

Tab. 2-8 Antikörper für Western Blot

Antikörper	Wirtsart	Molekularmasse [kDa]
Meerrettichperoxidase (HRP) Ziege-anti-Kaninchen IgG (Zweitantikörper)	Ziege	
β -Actin (D6A8) anti-Maus	Kaninchen	45
phospho-p38 [The180/Tyr182]		43
phospho -p44/42 MAPK (Erk1/2) [Thr202/Tyr204]	Kaninchen	42, 44
phospho -STAT-1 [Tyr701]	Kaninchen	85
phospho -STAT-2 [Tyr689]	Kaninchen	113
phospho -STAT-3 [Tyr705]	Kaninchen	79, 86
phospho -STAT-3 [Ser727]	Kaninchen	86
phospho -STAT-4 [Tyr693]	Kaninchen	81
phospho -STAT-5 [Tyr694]	Kaninchen	90

2.7.3 Sonstige Antikörper

Tab. 2-9 Sonstige Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
AK 720; monoklonaler Maus-anti-MuLV env (Isotyp IgG2b)	Aufgereinigt aus Hybridomazellüberstand
CD3 (aufgereinigt) AK, monoklonaler Hamster-anti-Maus	eBioscience
CD28 (aufgereinigt), monoklonaler Hamster-anti-Maus	eBioscience
IgG2b-HRP; monoklonaler Ziege-anti-Maus AK	Dianova

2.8 Versuchstiere

2.8.1 Wildtypmäuse

Tab. 2-10 Wildtypmäuse

Bezeichnung	Bemerkungen
Balb/c	Resistenzgene: H-2D ^{d/d} , Fv-2 ^{s/s} (bezogen von der Firma Charles River)
C57BL/6	Resistenzgene: H-2D ^{b/b} , FV-2 ^{r/r} (bezogen von der Firma Harlan)
CB6F1	F1 Generation von einer weiblichen BALB/c Maus und einer männlichen C57BL/6 Maus. Resistenzgene: H-2D ^{b/d} , FV-2 ^{r/s} (bezogen von der Firma Charles River)

2.8.2 Knockout (-/-) Mäuse

Tab. 2-11 Knockout (-/-) Mäuse

Bezeichnung	Bemerkungen
IFNAR ^{-/-}	Mäuse, die durch eine gezielte Mutation im <i>Ifnar</i> -Gen defizient für den IFNAR sind ^[93] . Gezüchtet am Zentralen Tierlabor, Universitätsklinikum Essen, Deutschland. Die Mäuse wurden freundlicherweise von Karl Lang zur Verfügung gestellt (Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Essen, Deutschland). Die Mäuse haben den C57BL/6 Hintergrund.

2.8.3 Transgene Mäuse

Tab. 2-12 Transgene Mäuse

Bezeichnung	Bemerkungen
FV TCRtg Mäuse	<p>DbGagL TCR-transgene (tg) Mäuse, die einen α/β-TCR auf CD8⁺ T Zellen exprimieren, der spezifisch für ein MHC-I-restringiertes Epitop des FV GagL Peptids (85-93) ist [25].</p> <p>Die Mäuse haben den C57BL/6 Hintergrund.</p>
FV TCRtg Mäuse x IFNAR ^{-/-}	<p>F2 Generation von FV TCRtg Mäuse und IFNAR^{-/-}.</p> <p>Genotyp: FV TCRtg (tg/tg) ; IFNAR^{-/-}</p> <p>Die Mäuse haben den C57BL/6 Hintergrund.</p>
HA TCRtg Mäuse	<p>CL4 (<i>specific Clone 4</i>) TCRtg Mäuse, die einen α/β-TCR auf CD8⁺ T Zellen exprimieren, der spezifisch für ein MHC-I-restringiertes Epitop von HA (H-2Kd:HA512–520) ist [150].</p> <p>Die Mäuse haben den Balb/c Hintergrund.</p>
ISRE-eGFP	<p>Mäuse, bei denen nach dem ISRE ein Gen für ein <i>enhanced green fluorescent protein</i> (eGFP) nachgeschaltet ist. Die Stärke des eGFP-Signals korreliert mit der Aktivierung des Interferon-induzierten Signalwegs und die daraus resultierende Bindung der ISRE-Konsensussequenz [217].</p> <p>Die Mäuse haben den C57BL/6 Hintergrund.</p>
OT-I Mäuse	<p>Ova TCRtg Mäuse, die einen α/β-TCR auf CD8⁺ T Zellen exprimieren, der spezifisch für ein MHC-I-restringiertes Epitop von Ovalbumin (257-264) ist [39].</p> <p>Die Mäuse haben den C57BL/6 Hintergrund.</p>

2.9 Zelllinien

Tab. 2-13 Zelllinien

Bezeichnung	Zusammensetzung
HEK293 T	Menschliche embryonale Nierenepithelzelllinie (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>), beinhaltet DNA-Bestandteile des menschlichen Adenovirus 5 und exprimiert das <i>SV40 large T-antigen</i> , welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem <i>SV40 origin of replication</i> ermöglicht. [200]
FBL-3	FV-transformierte Zelllinie [25]
<i>Mus dunni</i>	Murine Fibroblasten Zelllinie [115]
Mx/Rage 7	Virus-transformierte Zelllinie, mit einem temperatur-induzierbaren Promotor vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. [16]

2.10 Bakterien

Tab. 2-14 Bakterien

Bezeichnung	Bezugsquelle
5-alpha Kompetente <i>E.coli</i>	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

2.11 Plasmide

Tab. 2-15 IFN α Subtyp Plasmide

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
pkCMVint.	Expressionsvektor mit SV40 ori, HCMV IE1 Enhancer/Promotor, SV40 int polyA Signal, HCMV intron, MHC, Kan ^r	Vical Inc., USA
pkCMVint.IFN α 1	basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 1 Fragment -21 bis +525 Basenpaare (bp)	[238]
pkCMVint.IFN α 2	basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 2	[238]

	Fragment -21 bis +596 bp	
pkCMVint.IFN α 4	basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 4	[238]
	Fragment -21 bis +584 bp	
pkCMVint.IFN α 5	basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 5	[238]
	Fragment -18 bis +593 bp	
pkCMVint.IFN α 6	Basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 6	[238]
	Fragment -24 bis +590 bp	
pkCMVint.IFN α 9	basierend auf pkCMVint., enthält IFN α 9	[238]
	Fragment -25 bis +595 bp	

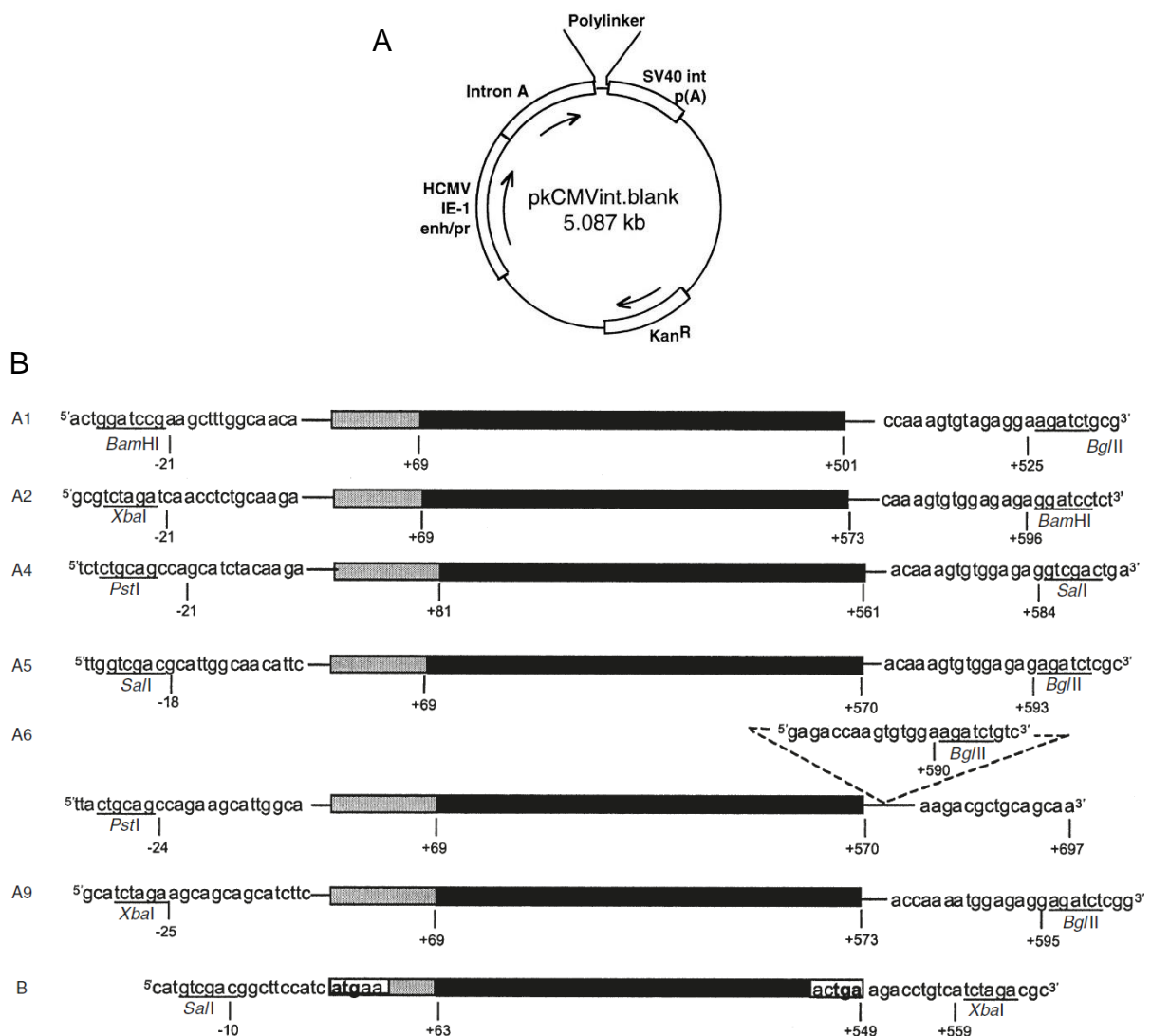


Abb. 2-1 Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids [238] und der enthaltenen Sequenzen der IFN α -Subtypen-Gen [31].

Der Säuger-Expressionsvektor pkCMV (Vical) (A) enthält die volle Länge der murinen IFN-Gene der Subtypen IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 9 und IFN α 11, eingeschlossen der Signalsequenz (grau unterlegt) des reifen Proteins (B).

Der Expressionsvektor pkCMV (CMV: Zytomegalievirus) wurde für die Transfektion der HEK293 T Zellen verwendet (Abb. 2-1A, B). Das im Überstand enthaltene IFN wurde für den Proliferationstest, Zytotoxizitätstest und für Therapieversuche in Mäusen verwendet.

2.12 Oligonukleotide

Selbst gestaltete Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net (Ulm) synthetisiert.

Tab. 2-16 Primer

Gen	Sequenz (5' → 3')	Initial-temperatur
<i>β-Actin</i>	forward: CAA GAA GGA AGG CTG GAA AA reverse: AAA TCG TGC GTG ACA TCA AA	53 °C
<i>IFNα</i>	forward: ATG GCT AGG CTC TGT GCT TTC C reverse: AGG GCT CTC CAG ACT TCT GCT CTG	53 °C
<i>IFNβ</i>	Bezogen von der Firma Qiagen.	53 °C

2.13 Software

Software	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San José (USA)
FACS Diva Software	BD, Heidelberg
FlowJo Software	Tree Star, USA
Image Studio™ Lite	Li-Cor bioscience, Bad Homburg
LEGENDplex v7.0 Software	Vigene Tech, Carlisle (USA)
StepOne Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellkultur erfolgte allgemein in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂/Luft-Gemisch. Die Mx/Rage7-Zellen wurden bei einer Temperatur von 32 °C kultiviert. Adhärenent wachsende Zelllinien wurden in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium dekantiert und die Zellen mit PBS gewaschen, um das restliche Medium zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 5 % Trypsin-EDTA überschichtet und für 5 min inkubiert bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Dieser Prozess wurde anschließend mit kaltem Vollmedium (Medium + 10 % FCS + 1 % P/S) gestoppt und die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (300 x g; 5 min). Das so gewonnene Zellpellet wurde in Vollmedium gelöst und im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in neue Kulturflaschen ausgesät. Suspensionszellen wurden in einer 6-Well-Platte kultiviert. Zum Verdünnen wurden die Zellen gemischt und einer 6-stufigen 1:5 Verdünnungsreihe mit frischem Medium ausgesät.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren:

Für die längere Lagerung der Zellen in Stickstoff wurden diese in Medium mit 10 % DMSO eingefroren. DMSO diffundiert durch die Zellmembran in die Zelle und ersetzt dort das Wasser. Es erhält somit die Löslichkeit in der Zelle und sorgt dafür, dass beim Einfriervorgang keine Eiskristalle gebildet werden, welche die Zellstruktur zerstören würden. Um die Zellen einzufrieren wurden diese auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml 10 %igen DMSO-haltigen Medium eingestellt und Aliquots eines entsprechenden Volumens über Nacht bei -80 °C in einem Gefrierbehälter (Mr. Frosty) gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen:

Bevor die in Medium mit 10 % DMSO eingefrorenen Zellen wieder in Kultur genommen werden können, muss zunächst das DMSO aus dem Medium entfernt werden. Hierfür wurden die Zellen schnell im Wasserbad (37 °C) aufgetaut, da das DMSO für die Zellen toxisch ist. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 10 ml warmem Vollmedium aufgenommen und zentrifugiert (300 x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut mit warmem Vollmedium gewaschen, um das DMSO gänzlich zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Vollmedium resuspendiert, in eine sterile Zellkulturflasche überführt und diese auf das entsprechende Volumen mit Vollmedium aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und gab zusätzlich Auskunft über den Vitalitätszustand der Zellen. Hierzu wurde ein Vitalitätstest durchgeführt, der darauf beruht, dass tote Zellen eine veränderte Membrandurchlässigkeit aufweisen. Farbstoffe, wie z.B. Trypanblau, können die Membran lebender Zellen nicht passieren und gelangen nur in tote Zellen. Beim Auszählen war darauf zu achten, keine Zellaggregate auszuzählen, da dies die Genauigkeit der Zählung beeinflussen kann.

Zum Zählen wurden die Zellen mit einer geeigneten Verdünnung mit Trypanblau versetzt und mittels einer Neubauer-Zählkammer vier Großquadrate à 16 Kleinquadraten ausgezählt.

Da jedes Quadrat eine Fläche von 0,04 mm² besitzt und eine Tiefe von 1 mm aufweist, ergibt sich ein Volumen von 0,004 µl. Die ermittelte Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\text{ Zelldichte (Zellen/ml) } = n \cdot 10^4$$

n = Mittelwert der gezählten Zellen

10⁴ = Volumenrechnungsfaktor für 1 mm³

Die Gesamtzellzahl wurde berechnet, indem die Zelldichte mit dem Volumen der zu bestimmenden Probe multipliziert wurde.

3.2 Herstellung von Interferonen

3.2.1 Vermehrung von Plasmiden

3.2.1.1 Retransformation

Für die Vermehrung wurden kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 0,5 - 1 µg Plasmid-DNA der IFNα Subtyp-Plasmide zu den Bakterien hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec, danach wurden 250 µl SOC-Medium zu den Bakterien hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten versetzt mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.2 Säulenaufreinigung von Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Nach der Überimpfung einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte in etwa 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und Inkubation für 6 h bei 37 °C wurde die Vorkultur in 200 ml LB-Medium (+ Kanamycin) überführt und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Darauf folgte die Isolation der Plasmid-DNA mit dem ZymoPURE™ Plasmid Maxipräp Kit nach Herstellerangaben.

3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte mit dem BioSpectrometer® basic der Firma Eppendorf.

3.2.2 Kalzium-Phosphat-Transfektion

HEK293 T Zellen lassen sich besonders einfach mit Kalziumphosphat-Präzipitaten transfizieren. Bei der Pufferherstellung ist die pH-Einstellung besonders wichtig, deshalb wurden zuvor die pH-Werte 7.0, 7.05 und 7.10 auf die Transfektionseffizienz hin überprüft. In den folgenden Experimenten wurde der HBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7.05 verwendet.

Am Tag vor der Transfektion wurden $1,3 \cdot 10^7$ Zellen pro T175-Zellkulturflasche in 50 ml Vollmedium ausgesät. Am Morgen, 1 h vor der Transfektion, wurde das

Medium entfernt und gegen 30 ml frisches Vollmedium ausgetauscht. Für jeden Ansatz wurden 100 µg Plasmid-DNA mit 1250 µl 2 M CaCl_2 und 0,001 % Chloroquin mit H_2O auf 5 ml aufgefüllt. Das CaCl_2 -DNA Gemisch wurde auf 5 ml 2 x HBS-Puffer getropft, während das HBS mit einer anderen Pipette unter Bildung von Luftbläschen aufgemischt wurde. Das fertige Transfektionsgemisch wurde für 1 min bei RT stehengelassen. In dieser Zeit wurden 20 ml des Mediums entfernt und beiseitegestellt, sodass für die eigentliche Transfektion nur 10 ml Medium pro T175-Zellkulturflasche übriggeblieben sind. Dann wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig auf die HEK293 T Zellen getropft und die T175-Zellkulturflasche hingelegt. Nach 3 min wurden die zuvor abgenommenen 20 ml Medium wieder vorsichtig auf die Zellen zurückgegeben. 7-10 h nach der Transfektion wurde das Medium vorsichtig entfernt und 30 ml DMEM + 2 % FCS + 1 % P/S zu den Zellen gegeben. 72 h nach der Transfektion wurde das Medium gesammelt und für 8 min bei 300 x g zentrifugiert, um Zellen aus dem Überstand zu entfernen. Die IFN α Subtyp-Konzentration wurde mit Hilfe eines Mx/Rage7-Bioassays (siehe 3.2.3) bestimmt.

3.2.3 Bestimmung der Interferonkonzentration mit Hilfe eines Mx/Rage7-Bioassays

Um die Konzentration der hergestellten IFN α Subtypen zu bestimmen, wurde ein Mx/Rage7-Bioassay durchgeführt. Diese Fibroblastenzelllinie exprimiert den IFN α -Rezeptor. Nach Bindung von murinem IFN α kommt es zur Expression einer Cre-Rekombinase, welche dann eine loxP-flankierte Resistenzgen-Kassette genaufwärts von eGFP deletiert. Dadurch kommt es zur Expression von eGFP, welches durchflusszytometrisch gemessen werden kann.

Für den Assay wurden $2 \cdot 10^4$ Mx/Rage7-Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der selbst hergestellten IFN α Subtypen inkubiert. Zusätzlich wurden Standardreihen mit kommerziell erhältlichem rekombinanten IFN α Subtypen (PBL Assay Science oder Thermo Scientific) und Negativkontrollen ohne IFN α mitgeführt. Die Zellen wurden 72 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, wobei nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die Zellen wurden mit 50 µl Trypsin abgelöst und erneut mit PBS

gewaschen (300 x g; 5min). Danach wurden die Zellen in FACS Puffer resuspendiert und mit Hilfe des Canto II Durchflussszytometers analysiert. Zur Ausgrenzung toter Zellen wurde kurz vor der Messung 7-AAD zu den Zellen hinzugegeben. Durch den Einsatz von Standardreihen rekombinanter IFN α Subtypen kann die genaue Konzentration an biologisch aktivem Protein in unbekannten Proben anhand der eGFP Expression ermittelt werden.

3.3 *In vitro* Versuche mit primären Mauszellen

3.3.1 Organentnahme aus Mäusen

Zur Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Bei den in Rückenlage an den Extremitäten aufgespannten Tieren wurden die zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten entnommen und bis zur weiteren Verwendung in einer 6-Well Platte mit 5 ml PBBS auf Eis gelagert. Zur Entnahme der Milz wurde die Peritonealhaut angehoben und eine kleine Öffnung hineingeschnitten. Durch diese Öffnung wurde die Milz mit einer stumpfen Pinzette herausgehoben und die beiden Blutgefäße durchtrennt. Anschließend wurde die Milz bis zur weiteren Verwendung in einer 6-well Platte mit 10 ml PBBS auf Eis gelagert. Zur Gewinnung von Knochenmark wurden beide Hinterbeine der Maus verwendet. Die Ober- und Unterschenkelknochen wurden von Muskeln und Sehnen befreit und ebenfalls in PBBS auf Eis gelagert.

3.3.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen

Zur Herstellung von Milz- bzw. Lymphknotenzellsuspensionen wurden diese Organe durch ein auf einem 50 ml Schraubverschlussröhrchen aufsitzenden Zellsieb gerieben und dieses Sieb anschließend mit einer entsprechenden Menge PBBS gespült. Zur Gewinnung von Knochenmarkzellsuspensionen wurde das Knochenmark mit Hilfe einer 2 ml Einmalspritze und einer G23 Kanüle mit insgesamt 5 ml PBBS durch die eröffneten Epiphysen der entsprechenden Knochen heraus gespült und die Zellsuspension in einem 15 ml Schraubverschlussröhrchen aufgefangen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 300 x g bei 10 °C für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit RPMI-Medium auf die jeweilige gewünschte

Zellzahl eingestellt und die Zellsuspensionen zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.3.3 Generierung von DCs aus Knochenmarkstammzellen

Für die Generierung von DCs wurden aus naiven Mäusen die Knochenmarkstammzellen isoliert und in 50 ml DC Medium, versetzt mit 1 ng/ml mrIL4 und 5 ng/ml mrGM-CSF, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf fünf 10 cm Petrischalen verteilt und für 8 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden der Zellkultur weitere 10 ml des DC Mediums hinzugefügt. 5 Tage nachdem die Zellen ausgesät wurden, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurden pro Petrischale ca. 15 ml des alten Mediums abgenommen und mit 300 x g bei 10 °C für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im entsprechend gleichen Volumen neuem DC Medium resuspendiert. Nach insgesamt 8 Tagen in Kultur konnten die nun ausdifferenzierten DCs für weitere Anwendungen verwendet werden.

3.3.4 Sortieren und Isolieren von CD8⁺ T Zellen aus einem Milzzellgemisch mittels MACS

Die MACS Methode (*Magnetic Cell Sorting*) ermöglicht die Auftrennung von Zellpopulationen aus einem Zellgemisch anhand ihrer Oberflächenmarker. Hierfür werden zwei Komponenten benötigt: die MACS *MicroBeads* und eine ferromagnetische Säule. Bei den Beads handelt es sich um kleine magnetische Kügelchen, die an monoklonale Antikörper gebunden sind.

Durch Inkubation des Zellgemisches mit den Beads binden die Antikörper spezifisch die entsprechenden Oberflächenmoleküle, so dass diejenigen Zellen, welche die Marker auf ihrer Oberfläche aufweisen, indirekt mit den Eisenkügelchen markiert werden. Beim anschließenden Transferieren des Zellgemisches auf die ferromagnetische Säule bleiben die markierten Zellen in der Säule, während die nicht markierten durchlaufen. Die markierten Zellen erhält man, indem man die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt und die zurückgehaltenen Zellen mittels MACS Puffer eluiert. Somit ergeben sich zwei Möglichkeiten der Auftrennung: zum einen eine Positivselektion, bei der die Population von Interesse mit MACS *MicroBeads*

markiert und von den restlichen Zellpopulationen abgetrennt wird, und zum anderen die der Depletion, bei der die mit MACS *MicroBeads* gekoppelte Zellen in der Säule zurückgehalten werden und sich die aufzureinigende Population im Durchfluss befindet. Die Qualität der Aufreinigung kann anschließend mit einer FACS-Analyse überprüft werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die CD8⁺ T Zell MACS Selektionen nach Herstellerangaben durchgeführt und mittels QuadroMACS® Separator sortiert. Die eluierten Zellen wurden mit MACS Puffer gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.3.5 Färbung von Zellen mit fluoreszierenden Zellfarbstoffen

Primäre Mauszellen wurden mit Hilfe von verschiedenen fluoreszierenden Zellfarbstoffen, wie Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) und *Cell Trace*™ Violet (VT), angefärbt. Diese Farbstoffe sind permeabel für die Zellmembran und binden sich kovalent an intrazelluläre Moleküle [169]. Durch die fortlaufende Halbierung des Fluoreszenzfarbstoffes bei jeder Zellteilung, ist dieser ebenfalls dafür geeignet, Zellproliferation zu verfolgen und am Durchflusszytometer zu analysieren. Für die Färbung wurden maximal $1 \cdot 10^8$ Zellen pro ml in zusatzfreiem RPMI Medium aufgenommen und mit 5 µM CFSE bzw. VT für 20 min bei 37 °C unter Schütteln angefärbt. Die Färbung wurde anschließend durch Zugabe des zehnfachen Volumens komplementierten RPMI Mediums abgestoppt.

3.3.6 Proliferationstest

Durch den *in vitro* Proliferationstest ist es möglich, spezifische Effekte von IFNα Subtypen auf CD8⁺ T Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden TCR-transgene (TCRtg) CD8⁺ T Zellen mit DCs co-kultiviert, die vorab mit einem spezifischen Viruspeptid beladen wurden. Demzufolge kommt es zur Antigen-spezifischen Aktivierung der TCRtg CD8⁺ T Zellen und zu deren Proliferation (Abb. 3-1).

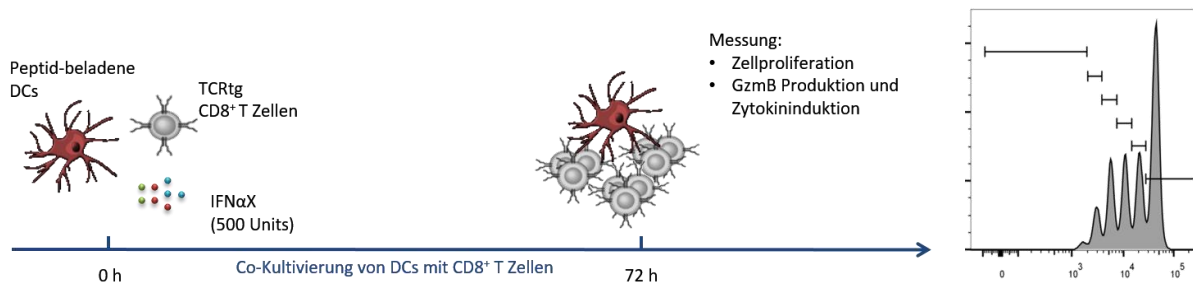


Abb. 3-1 Prinzip *in vitro* Proliferationstest

Für den Proliferationstest wurden die aus Knochenmark generierten DCs mit 0,1 µg/ml FV GagL Peptid (oder entsprechend 0,1 µg/ml HA Peptid bzw. Ova Peptid) für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Peptidbeladung wurden die DCs einmal gewaschen, bei 300 x g bei 10 °C für 8 min zentrifugiert und in komplementiertem RPMI Medium aufgenommen. TCRtg CD8⁺ T Zellen wurden aus naiven Mäusen mittels MACS Methode isoliert, mit VT gefärbt und ebenfalls in komplementiertem RPMI Medium aufgenommen. Für die Antigen-spezifische Aktivierung, wurden $2,5 \cdot 10^5$ TCRtg CD8⁺ T Zellen mit $0,5 \cdot 10^5$ DCs ausgesät, mit 500 Units eines IFNα Subtyps stimuliert und für 72 h co-kultiviert.

3.3.7 *In vitro* Zytotoxizitätstest

Der *in vitro* Zytotoxizitätstest ermöglicht eine Untersuchung der spezifischen Tötung von Zielzellen durch CD8⁺ T Zellen. Hierfür wurden FBL-3 Zellen verwendet, eine FV-transformierte Zelllinie mit C57BL/6 Hintergrund, die FV-Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. Somit können diese Zellen durch CD8⁺ T Zellen erkannt und eliminiert werden. Der *in vitro* Zytotoxizitätstest verläuft nach dem Prinzip des Proliferationstests (Abb. 3-2).

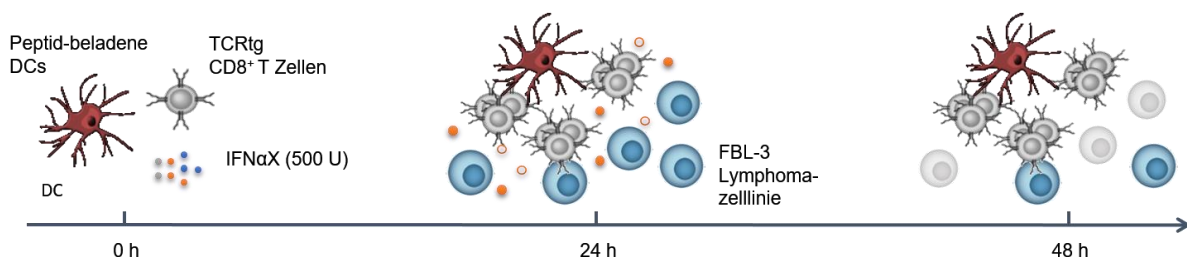


Abb. 3-2 Prinzip *in vitro* Zytotoxizitätstest

Isolierte FV TCRtg CD8⁺ T Zellen wurden in einem Verhältnis von 5:1 mit DCs ausgesät und mit 500 Units eines IFN α Subtypen stimuliert. Nach 24 h Co-Kultivierung wurden unterschiedliche Anzahlen von CFSE-gefärbten FBL-3 Zellen zu der Kultur dazugegeben und für weitere 24 bei 37 °C inkubiert. Um die Zytotoxizität zu messen, wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen und in 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)-versetztem FACS Puffer resuspendiert. Mittels Durchflusszytometrie konnten tote von lebenden FBL-3 Zellen abgegrenzt und somit der Anteil getöteter Zielzellen berechnet werden.

3.4 Herstellung und Nachweis von Friend Virus

3.4.1 *In vivo* Herstellung eines Friend Virus Stocks

Zur Herstellung eines FV-Stocks wurden Balb/c-Mäuse mit 3000 SFFU infiziert, nach neun Tagen getötet, die Milzen entnommen und ein Milzzellhomogenat (15 %) in PBBS mit 2 mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde aliquotiert und bei - 80 °C gelagert. Zur Titration dieses Stocks wurden CB6F1 Mäuse infiziert und den Tieren nach 14 Tagen die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung lassen sich maligne Zellhaufen, die durch die FV Infektion entstehen, auf der Milz anfärben. Die Anzahl dieser ausgezählten Foci ergibt die Viruskonzentration. Für die Infektion der Mäuse mit dem FV wurden Aliquots dieses Stocks mit sterilem PBS auf die gewünschte Viruskonzentration verdünnt und in die Mäuse injiziert.

3.4.2 Herstellung eines F-MuLV Stocks *in vitro*

Mus dunni Zellen wurden in T25-Zellkulturflaschen in 10 ml Vollmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurde zu den Zellen 50 μ l Polybren (0,8 μ g/ml) hinzugegeben, eine weitere Stunde später wurden die Zellen mit F-MuLV (MOI [*Multiplicity of infection*]=1) infiziert. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, nach drei Tagen mit Trypsin abgelöst und in Vollmedium aufgenommen. Zur Überprüfung des Anteils an infizierten *Mus dunni* Zellen wurden diese mit AK720 und PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus IgG2b Antikörper für jeweils 30 min inkubiert. Der prozentuale Anteil der infizierten Zellen wurde anschließend im

Durchflusszytometer bestimmt. Wenn die Zellen zu 50 - 100 % infiziert waren, wurden diese in T175-Zellkulturflaschen in 50 ml Vollmedium ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert, bis diese ca. 50 - 75 % konfluent waren. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand geerntet, aliquotiert und bei - 80 °C gelagert. Für die weitere Verwendung wurde die Aktivität des F-MuLV bestimmt. Der Test zur Bestimmung der Aktivität des F-MuLV-Stocks beruht auf dem Prinzip des *Infectious Center Assays* (siehe 3.4.3).

3.4.3 Nachweis von infektiösen Zellen mit Hilfe des *Infectious Center Assays*

Bei dem *Infectious Center Assay* wurde zur Bestimmung der Anzahl FV-infizierter Zellen eine Milzzellsuspension von FV-infizierten Mäusen hergestellt. Von der Suspension wurde eine Verdünnungsreihe (10^7 - 10^2 Zellen) mit *Mus dunni* Zellen als Indikatorzellen co-inkubiert. Infizierte Zellen übertragen das FV durch Zell-Zell-Kontakt an die *Mus dunni* Zellen. Diese teilen sich und geben das Friend Virus an ihre Tochterzellen weiter. Es entsteht ein Virus-Focus. Diese Foci wurden mittels Antikörperreaktion und Substratreaktion angefärbt. Als FV-spezifischer Antikörper wurde AK720 verwendet, welcher an das Hüllprotein von F-MuLV bindet. Der Zweitantikörper, welcher an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (Ziege-anti-Maus IgG2b-HRP), bindet kovalent an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Das lösliche Substrat AEC wird von der Peroxidase umgesetzt und in ein unlösliches rotes Produkt umgewandelt. Die roten Punkte markieren auf dem Zellrasen die Virus-Foci. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtzellzahl kann die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz bzw. im Knochenmark bestimmt werden.

Zunächst wurden in eine 6-Well Gewebekulturplatte pro Vertiefung $2 \cdot 10^4$ *Mus dunni* Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension der Milz bzw. des Knochenmarks auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Von einer Verdünnungsreihe wurden jeweils $1 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^2$ Zellen auf die *Mus dunni* Zellen gegeben und drei Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils 3 Vertiefungen mit F-MuLV und 3 weitere ohne Virus bzw. infizierte Zellen mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus musste Polybren (8 µg/ml)

hinzugegeben werden, damit das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden konnte.

Nach einer dreitägigen Inkubation wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden für 5 min mit 95 % Ethanol fixiert und zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung 700 µl Hybridomaüberstand des ersten Antikörpers (AK720) zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Der Hybridomaüberstand wurde nach Ablauf der Inkubationszeit verworfen und die Platten wurden zweimal mit PBS (+ 0,1 % BSA) gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG2b-HRP; 0,8 mg/ml) wurde 1:400 in PBS verdünnt, und davon wurden jeweils 700 µl pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und 1,5 h bei RT inkubiert. Nach dem Dekantieren und zweimaligem Waschen mit PBS (+ 0,1 % BSA) wurden jeweils 2 ml frisch angesetzte Substratlösung AEC zugegeben und 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abschütten, Waschen mit H₂O und Trocknen der Platten über Nacht wurden die Foci gezählt. Aus dem Mittelwert der Anzahl an Foci pro Verdünnung wurde die Anzahl infizierter Milz- oder Knochenmarkzellen pro Maus berechnet.

3.5 *In vivo* Versuche

3.5.1 Infektion

Die Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus wurde mit einer G25-Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt. Für akute FV Infektionen wurden die Mäuse mit 20.000 SFFU (engl. *Spleen Focus Forming Units*) infiziert. Für chronische FV Infektionen wurden 40.000 SFFU FV + 100.000 FFU (engl. *Focus forming units*) F-MuLV pro Maus injiziert.

3.5.2 Intraperitoneale Injektion von IFN α

Die IFN α Subtypen wurden jeweils in die Bauchhöhle (intraperitoneal, i.p.) der Maus injiziert. Bei der Injektion befand sich die Maus überspannt in Rückenlage. Das

Bauchfell war dabei gespannt, wodurch bei der Injektion keine inneren Organe verletzt werden konnten.

Für die i.p. Injektion von IFN α Subtypen wurden Zellkulturüberstände von transfizierten HEK293 T Zellen verwendet. Für Experimente während der akuten Phase der FV Infektion wurden pro Maus täglich ab dem ersten Tag nach der Infektion 8000 Units eines IFN α Subtyps verwendet. Für chronische Experimente wurden die Mäuse entweder in der frühen Phase der Infektion (1 - 9 Tage nach FV Infektion) oder in der späten Phase der Infektion (41 - 19 Tage nach Infektion) täglich mit 8000 Units IFN α 1 oder IFN α 11 behandelt. Die Injektion wurde mit einer G25-Kanüle durchgeführt.

3.5.3 Adoptiver Transfer von TCRtg CD8⁺ T Zellen und peptid-beladenen DCs

DCs (Wildtyp (WT) oder IFNAR^{-/-}) wurden, wie in 3.3.3 beschrieben, aus Knochenmarkstammzellen generiert und am 7. Tag für den adoptiven Transfer für 1,5 h mit 0,1 μ g/ml FV GagL Peptid beladen. Anschließend wurden die DCs gezählt und in PBS aufgenommen. TCRtg CD8⁺ T Zellen (WT oder IFNAR^{-/-}) wurden aus naiven Mäusen mittels MACS Methode isoliert, gezählt und in PBS aufgenommen. $2 \cdot 10^6$ CD8⁺ T Zellen und $0,4 \cdot 10^6$ DCs wurden kurz vor dem adoptiven Transfer gemischt und i.v. in IFNAR^{-/-} und WT Mäuse gespritzt.

3.5.4 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Der *in vivo* Zytotoxizitätstest ermöglicht eine Untersuchung der spezifischen Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen in der Maus, wobei die Eliminierung von Zielzellen, welche mit dem FV Peptid beladen sind, analysiert wird. Dazu wurden von naiven C57BL/6 Mäusen Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten isoliert. Die Milzzellsuspension wurde zusätzlich über einen Dichtegradienten aufgetrennt, um die Lymphozyten von Erythrozyten und Granulozyten zu befreien. Dazu wurde die Milzzellsuspension vorsichtig auf Percoll-Trennmedium pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (300 x g, 20 min) ohne Bremse, so dass sich die verschiedenen Milzzellen anhand ihrer Dichte auftrennten. Die Lymphozyten befanden sich nach der Zentrifugation in der mittleren Schicht. Diese wurden mit einer Pipette entnommen

und mit PBS gewaschen. Nach dem Waschschrift wurden die Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten vereinigt und auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Die Zellsuspension im ersten Röhrchen wurde mit 1 μM FV GagL spezifischem Epitop für 1,5 h bei 37 °C im Brutschrank beladen und anschließend mit 80 μM VT für 20 min bei 37 °C gefärbt. Als Kontrolle wurde die unbeladene Zellsuspension im zweiten Röhrchen mit 2 μM VT gefärbt. Durch die unterschiedlichen Konzentrationen an VT konnten beide Zellpopulationen später am Durchflusszytometer unterschieden werden. Als nächstes wurden die Zellen gezählt und im Verhältnis 1:1 zusammengeführt. Jeweils $6 \cdot 10^6$ Zellen wurden in IFNAR^{-/-} Mäusen, denen zuvor TCRtg CD8⁺ T Zellen und DCs adoptiv transferiert worden sind, gespritzt (3.5.3). Als Kontrollen wurden zusätzlich naive Akzeptormäuse und WT Mäuse mitgeführt. Nach 5 h wurden den Empfängertieren Milz und Lymphknoten entnommen, um diese auf die injizierten Zellpopulationen hin zu untersuchen. Im Durchflusszytometer wurde die Zellzahl beider Populationen gemessen. Die spezifische Eliminierung von Zielzellen durch CD8⁺ T Zellen wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Spezifische Lyse} = 100 \% \cdot 1 - \frac{\left(\frac{\text{unbeladen}}{\text{beladen}}\right)_{\text{Kontrollmäuse ohne Transfer}}}{\left(\frac{\text{unbeladen}}{\text{beladen}}\right)_{\text{IFNAR}^{-/-}\text{ Mäuse mit Transfer}}}$$

3.6 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Oberflächenproteine und intrazelluläre Proteine der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Die Zellen der Suspension werden einzeln durch einen Laserstrahl erfasst. Die Ablenkung der Strahlen beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird in zwei Kategorien aufgeteilt. Das Licht, welches die relative Größe der einzelnen Zellen detektiert, wird Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) genannt, und das Licht, das von den Zellen um 90° abgelenkt wird und somit Aussagen über die innere Granularität der Zellen erlaubt, wird Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) genannt.

Diese Methode ermöglicht unter anderem eine quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen. Die Grundlage dafür ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen binden die monoklonalen Antikörper, die gegen bestimmte Oberflächenmoleküle gerichtet sind. Zur Analyse werden die Zellen in einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte durch einen Photonendetektor registrierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Die Lichtsignale werden proportional zur Lichtstärke in elektronische Signale umgewandelt (Abb. 3-3). Die gleichzeitige durchflusszytometrische FACS Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

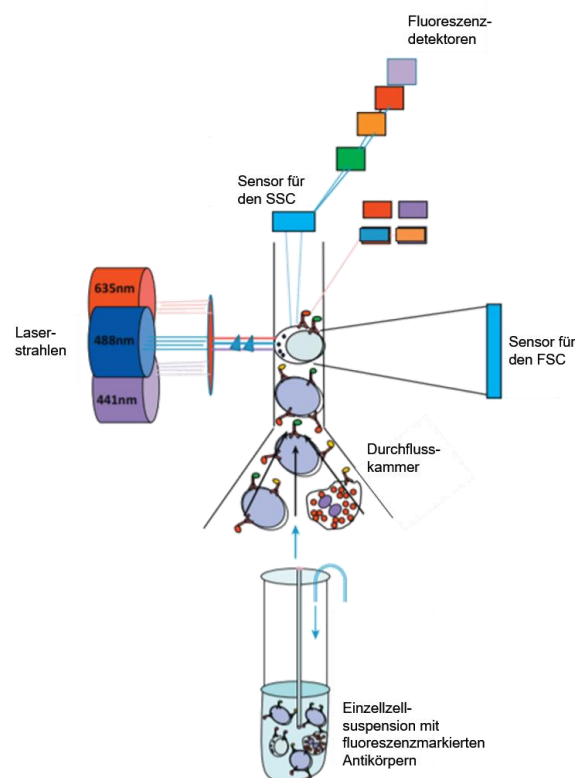


Abb. 3-3 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (Verändert nach [174])

Für jede FACS-Färbung werden die Zellen in FACS Puffer aufgenommen. Das in diesem Puffer enthaltene Natriumazid wirkt antibakteriell. EDTA verringert die Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand und BSA das Ausmaß an unspezifischen Antikörperbindungen. Bei der Auswertung, hier mit der *FlowJo* Software, wird ein Punktgraph (*Dotplot*) erstellt, in welchem jede Zelle als ein Punkt dargestellt ist. Die Position des Punktes im Graphen lässt Rückschlüsse auf die Zelleigenschaften zu. So können anhand der Größe und Granularität die Zellen im Punktgraphen aufgetrennt und unterschieden werden.

3.6.1 Färbung von Oberflächenproteinen

Es wurden $4 \cdot 10^6$ Zellen in FACS Puffer aufgenommen, für 3 min mit 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 µl FACS Puffer mit einer entsprechenden Verdünnung der konjugierten Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle, wie z.B. CD3, CD8, CD43, etc. aufgenommen und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden danach mit 200 µl FACS Puffer gewaschen (300 x g; 3 min) und anschließend in einem Volumen von 300 µl zur Messung resuspendiert.

Um tote Zellen und Zelltrümmer bei der Messung auszuschließen, wurde gleichzeitig zu der Oberflächenfärbung eine Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Dieser Lebend-Tot-Farbstoff (engl. *fixable viability dye*, FVD) ist impermeabel für lebende Zellen, durchdringt aber die Membran von toten Zellen, wodurch seine Detektion am Durchflusszytometer möglich ist. Zu den gefärbten Zellen wurde der FVD in einem Verhältnis von 1:8000 hinzugegeben.

3.6.2 Intrazelluläre Färbung von Granzym B

Zum Nachweis von intrazellulärem GzmB wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in FACS Puffer gewaschen (300 x g; 3 min) und dann nach dem Protokoll des Herstellers des Fixierungskits fixiert und permeabilisiert. Durch die Permeabilisierung können Antikörper, welche gegen intrazelluläre Proteine gerichtet sind, in die Zelle eindringen und diese binden. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden Waschpuffer wurden die Zellen mit 50 µl desselben Waschpuffers und mit GzmB Antikörpern für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend einmal mit Waschpuffer und einmal mit FACS Puffer gewaschen (350 x g; 4 min), in einem Volumen von 300 µl FACS Puffer resuspendiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.6.3 Intrazelluläre Färbung von IFN γ , IL-2 und TNF α

Um die Produktion von Zytokinen wie z.B. IFN- γ , IL-2 und TNF- α in den Zellen zu untersuchen, müssen diese zunächst zur Zytokinproduktion angeregt und die Sekretion verhindert werden, sodass die Zytokine in der Zelle akkumulieren. Für die CD8⁺ T Zellfärbung im Proliferationstest wurde daher 2 µg/ml Brefeldin A (BFA) für 4,5 h hinzugegeben. Für die Färbung der CD8⁺ T Zellen *ex vivo* wurden die Zellen für 5 h mit 10 µg/ml immobilisiertem α CD3, 2 µg/ml α CD28 und 2 µg/ml BFA in RPMI Medium (komplementiert mit 50 µM β -Mercaptoethanol) bei 37 °C inkubiert. Durch die Antikörper kommt es zu einer unspezifischen Stimulation des TCR und der damit verbundenen gesteigerten Zytokinsynthese. BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in der Zelle.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen und die Oberflächenmoleküle, wie bereits in 3.6.1 beschrieben, angefärbt. Danach erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und die Färbung intrazellulärer Proteine wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben. Die Zellen wurden nach der Färbung in einem Volumen von 300 µl mit FACS Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert.

3.6.4 Intranukleäre Färbung von Transkriptionsfaktoren

Zum Nachweis von intranukleären Foxp3 oder Eomesodermin (Eomes) wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in FACS Puffer gewaschen (300 x g; 3 min) und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers des *True Nuclear* Fixierungskits fixiert und permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden Waschpuffer wurden die Zellen mit 50 µl Waschpuffer und Foxp3 oder Eomes Antikörper für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit Waschpuffer und einmal mit FACS Puffer gewaschen

(350 x g; 4 min), in einem Volumen von 300 µl FACS Puffer resuspendiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.6.5 Tetramerfärbung

Eine Methode, um Antigen-spezifische T Zellen in einer T Zellpopulation zu identifizieren und quantifizieren, ist die Tetramerfärbung. MHC Klasse I-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC Klasse I-Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verknüpft sind. Der Komplex wird über einen konjugierten Fluorfarbstoff im Durchflusszytometer visualisiert. Diese Methode beruht auf den Wechselwirkungen des Antigen-spezifischen TCR mit den Peptid-bindenden MHC-I-Komplexen. Der Aufbau eines Tetramers ist in Abb. 3-4 gezeigt.

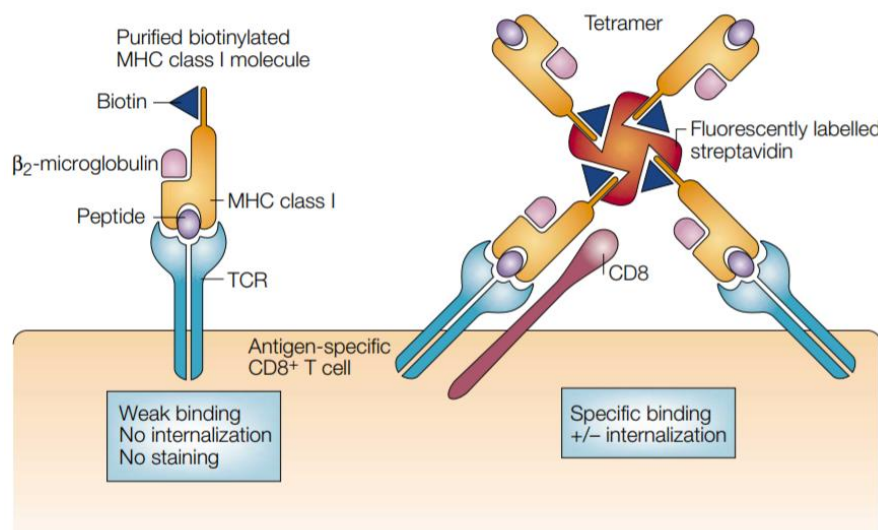


Abb. 3-4 Der Aufbau eines MHC I-Tetramers.

MHC I Tetramere bestehen im Allgemeinen aus vier biotinylierten MHC I Molekülen, die über Streptavidin verbunden sind, welches wiederum an ein Fluorochrom gekoppelt ist [111].

3.7 Proteinnachweis

3.7.1 LEGENDplex™

Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen wurden mittels LEGENDplex™ *Mouse Th Cytokine Panels* (13-plex) bestimmt. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die quantitative Analyse erfolgte mittels

durchflusszytometrischer Messung. Die Analyse wurde mit Hilfe der LEGENDplex v7.0 Software durchgeführt.

3.7.2 ELISA

Der IL-6, IL-10 und IL-12 ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.8 Arbeiten mit RNA

3.8.1 Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA

$1 \cdot 10^6$ Zellen wurden für 3 min bei 13.000 x g pelletiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 x g; 3min). Das Zellpellet wurde zunächst in 150 µl RNA Shield aufgenommen und resuspendiert, danach wurden 450 µl TRI-Reagent® dazugegeben und bei - 80 °C verwahrt.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem Direct-Zol™-RNA Minipräp Kit und wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Entgegen den Herstellerangaben wurde der Verdau eventuell noch vorhandener DNA durch RNase-freie DNase bei 37 °C für 30 min durchgeführt.

3.8.2 cDNA Synthese

Die reverse Transkription der isolierten mRNA zur komplementären DNA (engl. *complementary DNA*; cDNA) wurde mit dem All-in-One® cDNA Synthesis Supermix der Firma Bimake durchgeführt. Für eine optimierte Prozedur erfolgte die Inkubation für 10 min bei 25 °C, gefolgt von 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C.

3.8.3 Quantitative SYBR Green *Real Time* PCR

Die quantitative Analyse spezifischer cDNA-Abschnitte erfolgte mit Hilfe der Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (*Real Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Bei der RT-PCR wird das DNA-interkalierende Fluorochrom SYBR Green I genutzt. Eine Zunahme der Ziel DNA durch die Amplifikation führt zu einer Zunahme der

emittierten Fluoreszenz, die nach jedem PCR-Zyklus gemessen wird. Die Korrelation mit der emittierten Fluoreszenz eines Referenz-Gens (hier: β -Actin) mit bekannter Kopienzahl ermöglicht die relative Quantifizierung der cDNA-Abschnitte. Man unterscheidet ein *One Step* von einem *Two Step* Verfahren. Bei ersterem wird als Ausgangsmaterial RNA verwendet, die in der Initialphase zuerst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wird. Bei dem *Two Step* Verfahren ist eine reverse Transkription nicht notwendig, da als Ausgangsmaterial bereits synthetisierte cDNA dient. Der Initialphase folgt die zyklische Amplifikationsphase. Spezifische Primer (siehe Tab. 2-16) dienen der DNA Polymerase als Ausgangspunkt, welche die Ziel-DNA aus Desoxynukleotidphosphaten synthetisiert. Im nächsten Schritt wurde die amplifizierte DNA durch langsames Erhitzen von 60 °C auf 95 °C einer Schmelzpunktanalyse unterzogen. Jedes doppelsträngige DNA Produkt besitzt einen spezifischen Schmelzpunkt, abhängig von Länge und Basenzusammensetzung, bei dem es zu einzelsträngiger DNA denaturiert. So kann diese Analyse Aufschluss über eventuell amplifizierte Nebenprodukte geben. Die RT-PCR wurde unter Verwendung des PowerUp™ SYBR® Green MasterMix der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Für die reverse Transkription im *One Step* Verfahren wurde dem Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit ebenfalls von Thermo Fisher Scientific beigelegt. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

- 10 µl PCR Mix
- (0,2 µl Reverse Transcriptase → One Step)
- 4 µl 3' Oligonukleotide (10 µM)
- 4 µl 5' Oligonukleotide (10 µM)
- Ad 19 µl mit H₂O

19 µl des Mastermixes wurden pro Ansatz in eine 48-Well *MicroAmp*® Platte vorgelegt und im Anschluss 1 µl der zu bestimmenden Nukleinsäuren (RNA/cDNA) zugelegt. Als Negativkontrolle diente 1 µl H₂O anstatt der Nukleinsäuren und für die relative Quantifizierung wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe des Referenz-Gens β -Actin cDNA Standards mit bekannter Konzentration genutzt. Die Platte wurde kurz zentrifugiert (300 x g, 15 sek) und daraufhin für die Analyse in ein StepOne® PCR-System gegeben. Um eine vorzeitige Aktivierung der beteiligten Enzyme zu

verhindern, wurden die Arbeiten auf Eis durchgeführt. Die RT-PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tab. 3-1 RT-PCR Protokoll

Phase	Temp.	Dauer
Initialphase	48 °C (nur für <i>One Step</i>)	30 Min
	95 °C	10 Min
Amplifikations- zyklus (40x)	95 °C	15 Sek
	53 °C	20 Sek
	72 °C	40 Sek
Schmelzpunkt- analyse	94 °C	15 Sek
	60 °C	60 Sek
	95 °C	15 Sek
Kühlung	38 °C	60 Sek

$\Delta T: 0,3 \text{ °C/Sek}$

3.8.4 *One Step* RT-PCR der isolierten mRNA zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen

Das *One Step* RT-PCR Verfahren wurde angewendet, um die isolierte mRNA auf eventuell noch vorhandene DNA Verunreinigungen hin zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde ein Mastermix mit und ein Mastermix ohne reverse Transkriptase für das Ziel-Gen *β-Actin* angesetzt und die RT-PCR mit den mRNA-Proben wie beschrieben durchgeführt. Eine DNA Kontamination würde auch in dem Ansatz ohne reverse Transkription zu einem nachweisbaren PCR-Produkt führen. Gleichzeitig überprüft der Ansatz mit reverser Transkription das Vorhandensein von RNA. Falls in den Proben noch Verunreinigungen festgestellt wurden, erfolgte eine erneute Aufreinigung mittels DNA Verdau (siehe 3.8.1). Die quantitative Analyse erfolgte mit der StepOne Software v2.3.

3.8.5 *Two Step* RT-PCR für die Quantifizierung von *IFNα* und *IFNβ*

Die Expression von *IFNα* und *IFNβ* nach Stimulation von DCs mit Poly (I:C) und LPS für 6 h wurde durch eine *Two Step* RT-PCR quantitativ erfasst. Dazu wurde die

isolierte und auf Verunreinigungen geprüfte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben (siehe 3.8.2) und im Anschluss eine RT-PCR wie beschrieben durchgeführt. Die Angabe der IFN-vermittelten Expression erfolgt in Relation zu der Expression des Referenzgens *β-Actin*. Die quantitative Analyse erfolgte mit der StepOne Software v2.3.

3.8.6 RNA Flow Durchflusszytometrie

Der *PrimeFlow* RNA™ Assay ermöglicht die Untersuchung von intrazellulärer mRNA auf der Ebene von einzelnen Zellen. In dieser Arbeit wurde die Expression der *IL-10* mRNA in CD8⁺ T Zellen und DCs quantifiziert.

Dafür wurde der Proliferationstest (vgl. 3.3.6) mit der 10-fachen Menge an Zellen, nämlich mit $2,5 \cdot 10^6$ TCRtg CD8⁺ T Zellen und $0,5 \cdot 10^6$ DCs, angesetzt und mit 5000 Units IFN α 4 stimuliert. Nach 24 h Co-Kultivierung wurde der *PrimeFlow* RNA™ Assay nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Entgegen den Herstellerangaben wurden die Versuchsschritte der Signalamplifikation wie z.B. die Anlagerung der *PreAmplifier* Moleküle, die darauffolgende Anlagerung multipler *Amplifier* Moleküle und die darauffolgende Anlagerung der fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Markierungssonden-Oligonukleotide auf 2 h Inkubationszeit erhöht.

3.9 Arbeiten mit Proteinen

3.9.1 Stimulation von CD8⁺ T Zellen und DCs mit IFN α Subtypen

Für die *in vitro* Stimulation der CD8⁺ T Zellen mit den IFN α Subtypen wurden mindestens $2,5 \cdot 10^6$ Zellen, für die DCs mindestens $1 \cdot 10^6$ Zellen in einer 24-Well-Gewebekulturplatten ausgesät und mit 1000 Units des entsprechenden IFN α Subtyps für 15 oder 30 min stimuliert. Unstimulierte Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt.

3.9.2 Herstellung von Zelllysaten

Um die stimulierten Zellen zu lysieren, wurden sie für 3 min bei 13.000 x g pelletiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 x g; 3min). Nach dem Waschschrift wurden die Zellen zügig in 100 µl Lysepuffer versetzt mit 0,5 µl PMSF (200 mM) aufgenommen, gevortext und für 40 min auf Eis gelagert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (13.000 x g; 3min). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.9.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit Hilfe des DC™ Protein Assay von Bio-Rad wurde die Proteinkonzentration nach Herstellerangaben bestimmt. Das quantitative kolorimetrische Verfahren basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowrey, die Messung erfolgte bei 570 nm.

3.9.4 SDS Gele

Für Western Blots wurden 10 %ige SDS Gele entsprechend folgender Zusammensetzung verwendet:

Tab. 3-2 Zusammensetzung SDS-Gele

Sammelgel		Trenngel	
Substanz	Volumen	Substanz	Volumen
0,5 M TRIS pH 6,8	2 ml	2 M TRIS pH 8,8	6 ml
10 % SDS	40 µl	10 % SDS	120 µl
H ₂ O	1,4 ml	H ₂ O	1,8 ml
30 % Acrylamid	560 µl	30 % Acrylamid	4 ml
TEMED	6 µl	TEMED	10 µl
APS	40 µl	APS	120 µl

Zu beachten ist, dass das Acrylamid zuletzt hinzugefügt wird, da es für die Quervernetzung der ansonsten linearen Polyacrylamid-Ketten verantwortlich ist, wodurch ein starres Gel entsteht.

3.9.5 SDS Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese in einem SDS-Polyacrylamid-Gel dient zur Trennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben in 5 x Lämmli-Puffer bei 95 °C für 10 min inkubiert. Der Zusatz von SDS und β -Mercaptoethanol verhindert zusätzlich, dass nicht vollständig getrennte Tertiär- und Quartärstrukturen die Trennung verfälschen. Es wurde eine negative Ladung erzeugt, wodurch im Trenngel die entfalteten Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Die Auftrennung beruht auf unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten beim Passieren des Gels. Diese sind umgekehrt proportional zur Molekülmasse.

Nach dem Aufbau der Elektrophorese-Apparatur erfolgte die Beladung des Gels mit den Proteinproben und dem Größenstandard. Anschließend wanderten die entfalteten Proteine durch ein Sammelgel, dann durch ein Trenngel bei 120 V für mind. 2 h. Nach einer erfolgreichen Auftrennung wurde das Gel für weitere Analysen (Western Blot) genutzt.

3.9.6 Western Blot

Das Western Blot Verfahren beruht auf der Detektion von Proteinen mittels Bindung von spezifischen Antikörpern. Voraussetzung ist die Denaturierung des Proteingemisches und die elektrophoretische Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel (3.9.4). Für den *semi-dry*-Proteintransfer wurde mit dem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System der Firma Bio-Rad gearbeitet. Zunächst wurden 2 Lagen Transfer-Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran für 2 bis 3 min in Transfer-Puffer getränkt. Anschließend wurde, beginnend mit einer Lage Filterpapier auf der Elektrode (Anode), gefolgt von der Nitrozellulosemembran, dem Gel und einer weiteren Lage Filterpapier und mit der zweiten Elektrode (Kathode) die Apparatur geschlossen. Der Transfer erfolgte bei 1,3 A, 25 V für 7 min. Nach dem Transfer wurde die Membran für ein bis zwei Minuten in Ponceau S gefärbt, um eine erfolgreiche Proteinübertragung zu überprüfen. Diese Färbung und die nachfolgenden aufgelisteten Waschschriffe wurden alle, wenn nicht anders erwähnt, bei RT und auf einem 3D-Orbitalschüttler durchgeführt. Durch die Zugabe von H₂O dest. für einige Minuten konnte die Membran entfärbt werden und anschließend für 1 h bei

RT im Blockierungs-Puffer inkubiert werden. Hierbei wurden unspezifische Bindungen blockiert. Es folgten drei Waschschr tte für je 5 min in 1 x TBS-T. Der Erstantikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in 1 x TBS-T und 5% BSA verdünnt und über Nacht bei 4  C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper-Lösungen verworfen und die Membran fünfmal mit 1 x TBS-T für jeweils 5 min gewaschen. Der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundär-antikörper wurde entsprechend verdünnt und ebenfalls in 1 x TBS-T und 5 %igen Magermilchpulver für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach der Inkubation folgten drei weitere Waschschr tte in 1 x TBS-T. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde das Reagenz *SignalFire*TM auf den Western Blot aufgetragen und über Röntgenfilme visualisiert.

3.9.7 PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array

Die Anwendung des *PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array* erlaubt die Immundetektion von Proteinen basierend auf den Grundlagen eines Western Blots und eines Sandwich-Immunassays, wobei es hier jedoch nicht wie bei der Western Blot Methode zur Denaturierung der Proteine kommt. Der Test beruht auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung durch zwei Antikörper. Der unkonjugierte Primärantikörper ist immobilisiert und kann von dem Antigen, welches in der Probelösung enthalten ist, gebunden werden. Die Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers führt zu einer weiteren Antigen-Antikörper-Bindung. Durch das Biotin kann der Sekundärantikörper nachfolgend von einem Streptavidin-tragenden Enzymkonjugat erkannt und gebunden werden. Da das Konjugat zusätzlich mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, konnte die Chemilumineszenz durch Zugabe des *SignalFire*TM Reagenz über Röntgenfilme detektiert werden.

Der *PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array* wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proteinexpression wurde anhand eines Intensitätsvergleichs der Dichte der Signale auf den Röntgenfilmen densitometrisch mit Hilfe der Image StudioTM Lite Software analysiert.

4 Ergebnisse

Die Ausschüttung von Typ I IFN ist ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen. Durch die induzierte Expression von ISGs können sie einen antiviralen Status in infizierten und benachbarten Zellen induzieren, sind aber auch in der Lage, die angeborene und adaptive Immunantwort zu regulieren. Des Weiteren besitzen Typ I IFN eine antiproliferative Kapazität und regulieren somit die massive Vermehrung verschiedener Immunzellen. Typ I IFN gehören zu einer großen Zytokinfamilie, zu welcher in der Maus 14 verschiedene IFN α Subtypen zählen, aber nur ein IFN β . Obwohl alle IFN α Subtypen hoch konserviert sind (75 - 99 % der Aminosäuresequenzen sind identisch) und alle Subtypen den gleichen Rezeptor binden, besitzen sie unterschiedliche biologische Funktionen und sind nicht redundant [75, 246].

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, wie sieben verschiedene IFN α Subtypen durch ihren antiviralen Effekt die Viruslast einer akuten FV Infektion in Mäusen reduzieren konnten. Es wurde berichtet, dass die IFN α -induzierte Expression antiviraler Proteine die Virusreplikation direkt inhibieren konnte, sowie Zellen des angeborenen Immunsystems, wie z.B. NK Zellen verstärkt aktiviert wurden [61, 65]. Zusätzlich war die Expression zahlreicher ISGs, wie z.B. Mx1 und ISG15, sowohl in der Milz als auch im Knochenmark nach IFN α Behandlung signifikant erhöht [76]. Die IFN α 11-induzierte Aktivierung von NK Zellen wirkte sich außerdem positiv auf deren Effektorfunktionen aus und steigerte die NK-Zell-Zytotoxizität gegen FV-transformierte Zellen [65]. Des Weiteren wurden erste Erkenntnisse in Bezug auf den Einfluss von IFN α auf CD8⁺ T Zellen während der FV Infektion gewonnen [61]. Hier konnte gezeigt werden, dass nach IFN α 1 Behandlung sowohl die Anzahl FV-spezifischer CD8⁺ T Zellen zunahm, als auch die Viruslast signifikant sank.

Eine ausreichende CD8⁺ T Zellantwort benötigt zwei Signale, nämlich die Erkennung von viralen Antigenen, die über MHC I präsentiert werden, sowie die Stimulation von Co-Rezeptoren über verschiedene Liganden (u.a. CD80 und CD86). Ein drittes Signal wird schließlich benötigt, um eine effiziente CD8⁺ T Zellantwort zu induzieren, die über die Stimulation von Zytokinen wie z.B. Typ I IFN oder IL-12 vermittelt wird [35].

Die genauen immunmodulatorischen Funktionen von IFN α auf diverse Zellpopulationen wie z.B. CD8 $^{+}$ T Zellen sind bisher nicht vollständig verstanden. Daher ist es von Interesse, die funktionalen Unterschiede der IFN α Subtypen weiter zu charakterisieren und inwiefern sie die CD8 $^{+}$ T Zellantworten beeinflussen können.

4.1 Immunmodulatorische Effekte von IFN α Subtypen auf Antigen-spezifische CD8 $^{+}$ T Zellen *in vitro* und *in vivo*

4.1.1 IFN α Subtyp Stimulation supprimiert die Proliferation von CD8 $^{+}$ T Zellen *in vitro*

Um einen detaillierteren Einblick darüber zu bekommen, wie sich IFN α Subtypen auf die adaptive Immunantwort und im Besonderen auf die Regulation von Virus-spezifischen CD8 $^{+}$ T Zellen auswirken, wurde der Effekt verschiedener IFN α Subtypen auf die Proliferation und Effektorfunktionen von CD8 $^{+}$ T Zellen untersucht. Dafür wurde ein FV-spezifischer CD8 $^{+}$ T Zell Proliferationstest durchgeführt, für den CD8 $^{+}$ T Zellen aus FV CD8 $^{+}$ TCRtg Mäusen isoliert wurden. Ca. 95 % der CD8 $^{+}$ T Zellen dieser Mäuse besitzen einen TCR, der aus einer transgenen α - und β -Kette zusammengesetzt ist und spezifisch ein H-2 b -restringiertes Epitop des FV GagL Peptids erkennt [25]. Diese CD8 $^{+}$ T Zellen wurden mit dem fluoreszierenden Zellfarbstoff VT gefärbt und für 72 h mit FV Peptid beladenen DCs, die aus dem Knochenmark naiver Mäuse generiert wurden, mit oder ohne IFN α Subtypen (500 Units/Well) co-kultiviert. Dadurch wurden die Virus-spezifischen CD8 $^{+}$ T Zellen Antigen-spezifisch aktiviert und zur Proliferation angeregt.

Nach 72 h waren alle unbehandelten CD8 $^{+}$ T Zellen vollständig aktiviert (Expression von CD69, Daten nicht gezeigt) und zeigten eine enorme Proliferationskapazität, die auf bis zu 98 % proliferierende Zellen anstieg (Abb. 4-1 A + B). Um ausschließen zu können, dass endogen gebildetes Typ I IFN der DCs einen Effekt auf die CD8 $^{+}$ T Zellen hatte, wurde die IFN α - oder IFN β -mRNA in DCs mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR bestimmt (Abb. 4-1 C). Als Positivkontrolle wurden die DCs mit Poly (I:C) oder LPS stimuliert. Da beide Typ I IFN in der unstimulierten Probe nicht detektiert werden konnten, wurde eine endogene IFN α oder IFN β Produktion ausgeschlossen.

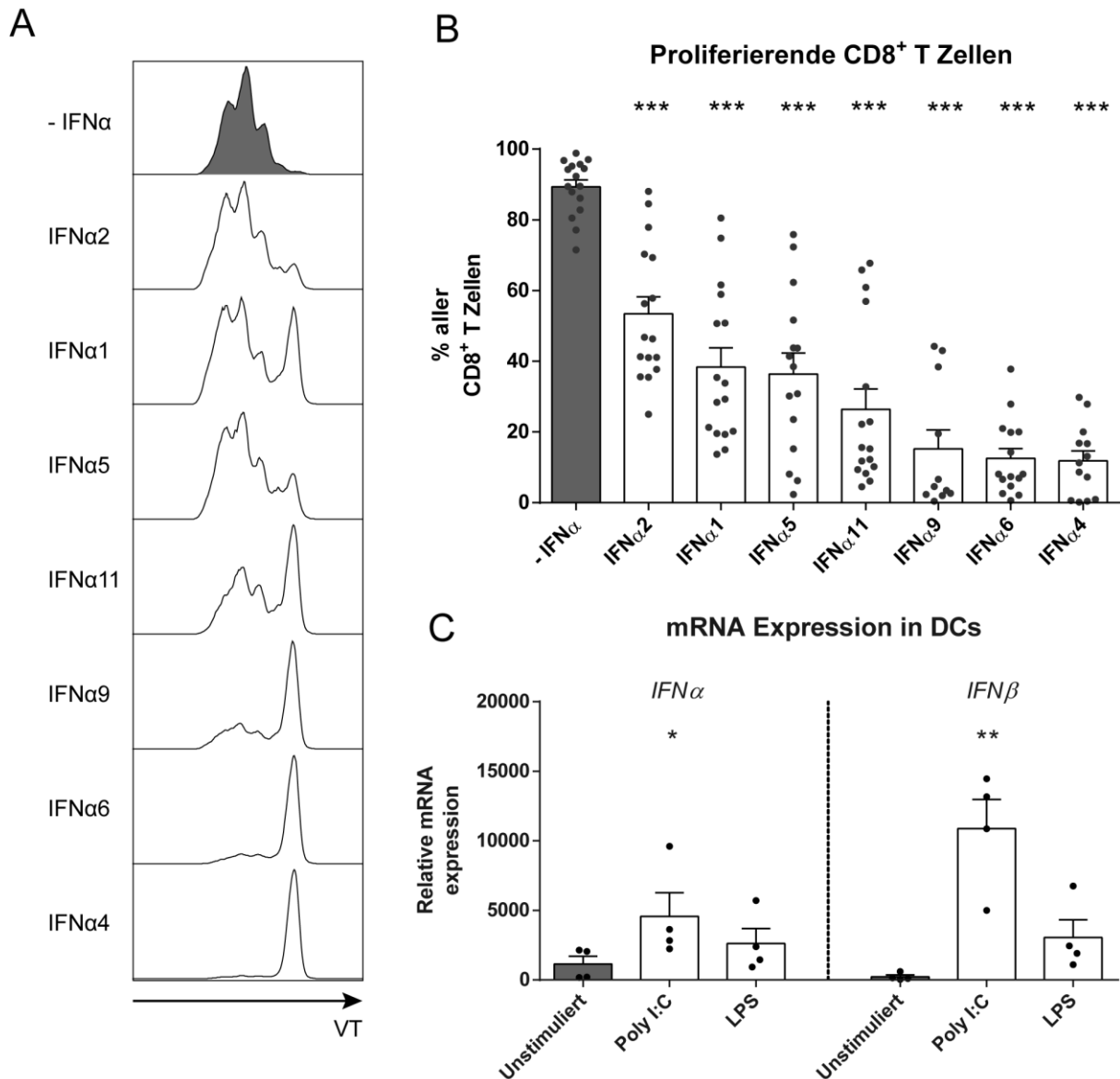


Abb. 4-1 Analyse der CD8⁺ T Zell Proliferation nach Stimulation mit IFN α Subtypen.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/ml). Die CD8⁺ T Zellproliferation wurde als Verlust des fluoreszierenden Zellfarbstoffs VT durchflusszytometrisch gemessen. (A) Ein repräsentatives Histogramm und (B) die Mittelwerte + Standardfehler der Mittelwerte (+SEM) von $n \geq 12$ Experimenten sind gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Ordinary One Way ANOVA* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als *** für $p < 0,001$ angezeigt. (C) Die Expression von IFN α mRNA und IFN β mRNA in DCs. Die relative mRNA Expression wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit Poly (I:C) oder LPS für 6 h. Die Zellen wurden geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Mindestens 4 unabhängige Experimente wurden durchgeführt und die Proben wurden jeweils in Doppelbestimmungen untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp-stimulierten DCs und den Kontrollen wurden mit Hilfe des *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$ und ** für $p < 0,01$ angezeigt.

Nach IFN α Subtyp Stimulation mit 500 Units/Well zeigten die CD8⁺ T Zellen im Vergleich zu denen im unbehandelten Ansatz eine reduzierte Proliferation, was den

allgemein bekannten antiproliferativen Effekt von IFN α bestätigte [52]. Allerdings waren Unterschiede zwischen den einzelnen IFN α Subtypen erkennbar. So hatte IFN α 4 eine viel stärkere antiproliferative Kapazität und reduzierte den Anteil an proliferierenden CD8 $^{+}$ T Zellen auf durchschnittlich 11,8 % im Vergleich zu IFN α 2, welches den geringsten antiproliferativen Effekt hatte und die CD8 $^{+}$ T Zellproliferation auf nur durchschnittlich 53,4 % reduzierte (Abb. 4-1 B). Einen ähnlich starken antiproliferativen Effekt wie IFN α 4 hatten auch die Subtypen IFN α 6 (12,5 %) und IFN α 9 (15,2 %). Die Subtypen IFN α 1 (38,3 %), IFN α 5 (36,3 %) und IFN α 11 (26,4 %) wiesen jeweils eine moderate antiproliferative Kapazität auf. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass IFN α einen antiproliferativen Effekt aufwies, der in seiner Stärke jedoch IFN α Subtyp-spezifisch war. In Abb. 4-1 B sind die Mittelwerte der CD8 $^{+}$ T Zell Proliferation gezeigt und die IFN α -stimulierten Gruppen sind entsprechend ihrer antiproliferativen Kapazität sortiert.

4.1.2 IFN α Subtyp Stimulation verbessert den Effektorphänotyp von CD8 $^{+}$ T Zellen

Es ist bekannt, dass IFN α die angeborene und adaptive Immunantwort regulieren kann [35, 71]. Durch die Bereitstellung eines dritten Signals an naive CD8 $^{+}$ T Zellen, die zuvor Antigen-spezifisch und durch kostimulatorische Liganden aktiviert worden sind, sichert IFN α das Überleben von CD8 $^{+}$ T Zellen und induziert zusätzlich die Produktion von Zytokinen [35]. Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob die Stimulation mit IFN α Subtypen eine Verbesserung der Effektorfunktionen von CD8 $^{+}$ T Zellen hervorruft. Die Versuche wurden, wie bereits in 4.1 erwähnt, durchgeführt. CD8 $^{+}$ T Zellen wurden nach 72 h auf die Expression von intrazellulären Zytokinen, nämlich IFN γ , IL-2 und TNF α , sowie GzmB als zytotoxischer Marker durchflusszytometrisch untersucht. In Abb. 4-2 ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse von CD8 $^{+}$ T Zellen und ihrer intrazellulären Produktion von GzmB und Zytokinen gezeigt.

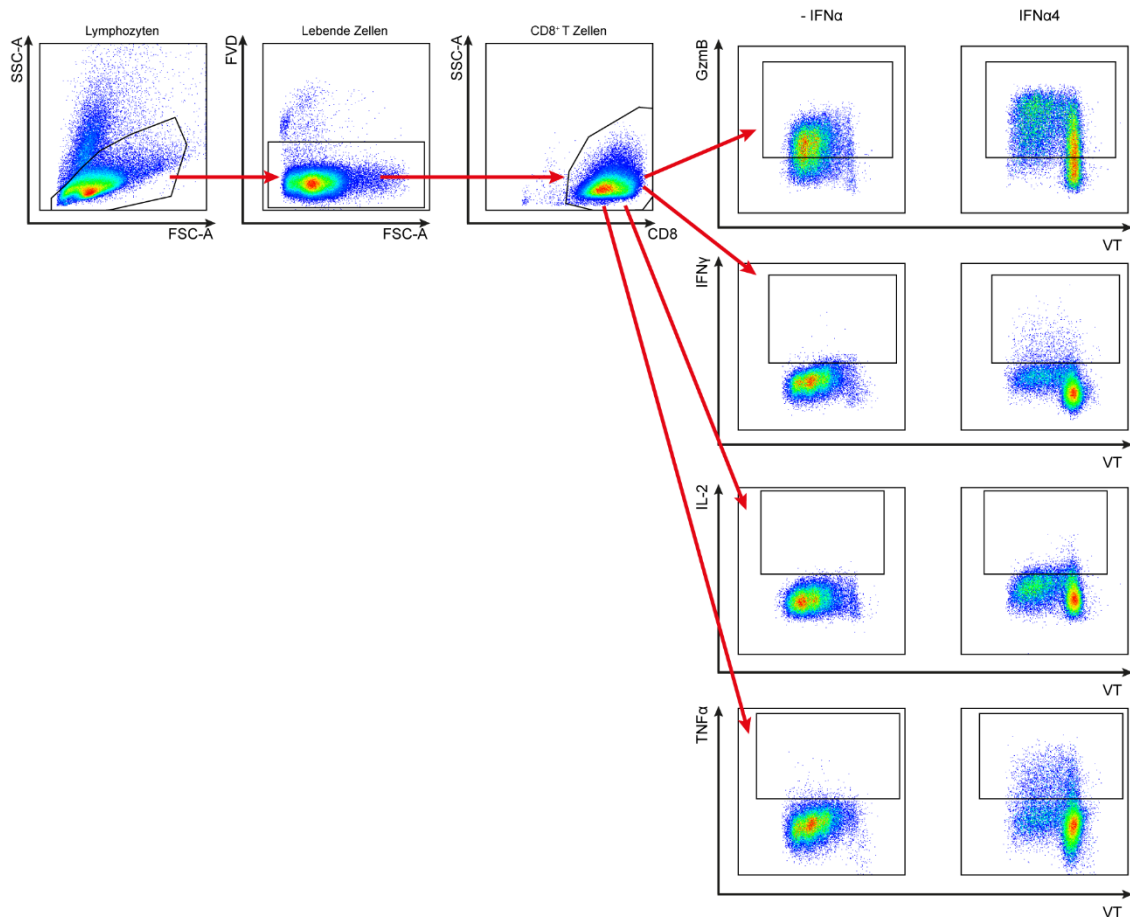


Abb. 4-2 Schematische Darstellung für die durchflusszytometrische Analyse der CD8⁺ T Zellen hinsichtlich der intrazellulären Expression von Zytokinen sowie GzmB nach IFN α Subtyp Stimulation.

CD8⁺ T Zellen wurden zunächst im *Dotplot* im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht entsprechend ihrer Größe eingegrenzt, tote Zellen wurden exkludiert und CD8⁺ T Zellen wurden gemäß ihres charakteristischen Oberflächenmarkers CD8 ausgewählt. Anschließend konnte eine genaue Untersuchung von intrazellulär gebildeten Zytokinen sowie GzmB durchgeführt werden. Die Analyse wurde mit Hilfe der *FlowJo* Software durchgeführt.

Die Antigen-spezifische Aktivierung von CD8⁺ T Zellen induzierte die Expression von GzmB, sowohl in dem unbehandelten Ansatz als auch in den IFN α Subtyp-behandelten Ansätzen (Abb. 4-3 A). Obwohl der prozentuale Anteil an GzmB-produzierenden CD8⁺ T Zellen innerhalb der Gruppen vergleichbar war, konnte man anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) analysieren, ob es quantitative Mengenunterschiede bezüglich der GzmB-Produktion gab (Abb. 4-3 B). Hier war zu erkennen, dass IFN α Subtyp-behandelte CD8⁺ T Zellen signifikant mehr GzmB produzierten (MFI: 3700 - 4700), als die in der unbehandelten Kontrolle (MFI: 1600). Die Stimulation mit IFN α führte also zu einer verstärkten Produktion von GzmB auf Einzelzellebene, allerdings waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen zu erkennen.

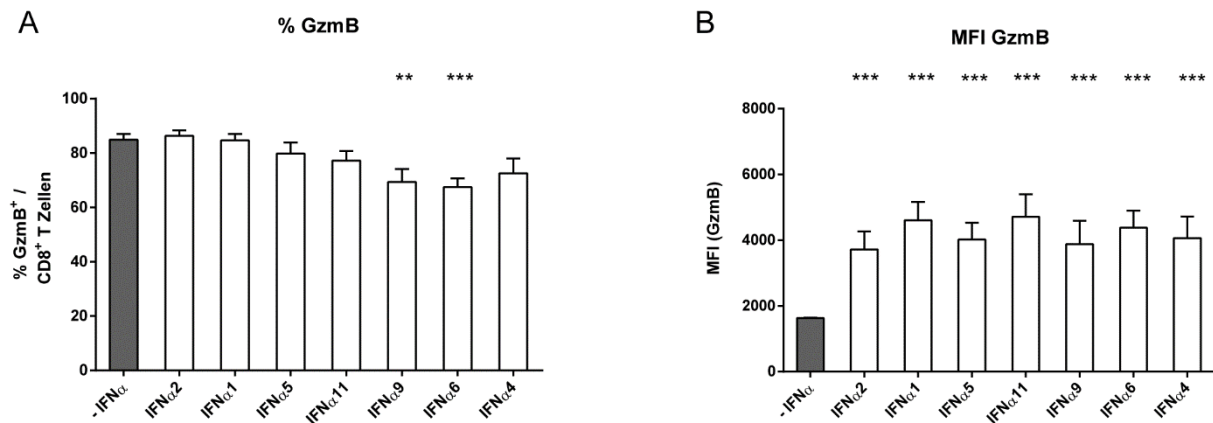


Abb. 4-3 Analyse der intrazellulären GzmB Produktion in CD8⁺ T Zellen nach IFNα Subtyp Stimulation.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (± 500 Units IFNα Subtyp/Well). Die intrazelluläre Produktion von GzmB in CD8⁺ T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Die prozentualen Anteile GzmB-produzierender CD8⁺ T Zellen und (B) die quantitative Expression an GzmB, gemessen als MFI, sind gezeigt. Die Mittelwerte (\pm SEM) von $n=15$ Experimenten sind als Balken in antiproliferativer Reihenfolge dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit IFNα Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Ordinary One Way ANOVA* oder den *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$ angezeigt.

Als nächstes sollte die intrazelluläre Expression von Zytokinen untersucht werden, die charakteristisch für eine effektive CD8⁺ T Zellantwort sind, wie z.B. IL-2, IFNγ und TNFα [151, 194, 229]. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte in allen IFNα Subtyp-stimulierten Ansätzen eine Verbesserung der Zytokinantwort gemessen werden. So stieg sowohl der prozentuale Anteil an IFNγ-, IL-2- und TNFα-produzierenden CD8⁺ T Zellen (Abb. 4-4 A-C), als auch die Expression der entsprechenden Zytokine in den Zellen, was durch eine erhöhte MFI messbar war (Abb. 4-4 D-F).

Beim Vergleich zwischen den Gruppen konnten teilweise große Unterschiede zwischen den IFNα Subtypen beobachtet werden. Vor allem die Subtypen IFNα4 und IFNα6 vergrößerten sowohl den Anteil IL-2-produzierender CD8⁺ T Zellen (IFNα4: 2,2 %; IFNα6: 2,1 %) als auch den der TNFα-produzierenden CD8⁺ T Zellen (IFNα4: 7,8 %; IFNα6: 7,6 %) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (IL-2: 0,3 %; TNFα: 1,6 %). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch quantitativ, in Bezug auf die produzierte Menge an IL-2 (ohne IFNα: MFI 2200; IFNα4: MFI 3000; IFNα6: MFI 3100) und TNFα (ohne IFNα: MFI 2300; IFNα4: MFI 4300; IFNα6: MFI 5000) anhand der gemessenen MFI beobachtet werden. IFNα2 (IL-2: 1,2 %; TNFα: 4,3 %), also der Subtyp mit dem geringsten antiproliferativen Effekt, vergrößerte den Anteil IL-2- und

TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen vergleichsweise wenig (Abb. 4-4 B+C). Auch die exprimierte Menge an IL-2 und TNF α , gemessen als MFI, war hier deutlich geringer (IL-2: MFI 2600; TNF α : MFI 3300) als im Vergleich zu den anderen IFN α Subtypen (Abb. 4-4 E+F). IFN γ wurde als einziges Zytokin von allen Subtypen gleich stark erhöht (Abb. 4-4 A+B). Der Anteil IFN γ -produzierender CD8⁺ T Zellen war jedoch deutlich höher verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Zwischen den IFN α Subtypen konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Abb. 4-5 bestätigt eine signifikante positive Korrelation zwischen der antiproliferativen Kapazität der IFN α Subtypen und dem Anteil IL-2- und TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen. Es rufen diejenigen IFN α Subtypen mehr IL-2- und TNF α -produzierende CD8⁺ T Zellen hervor, die auch eine stärkere antiproliferative Kapazität besaßen, wie z.B. IFN α 4 und IFN α 6.

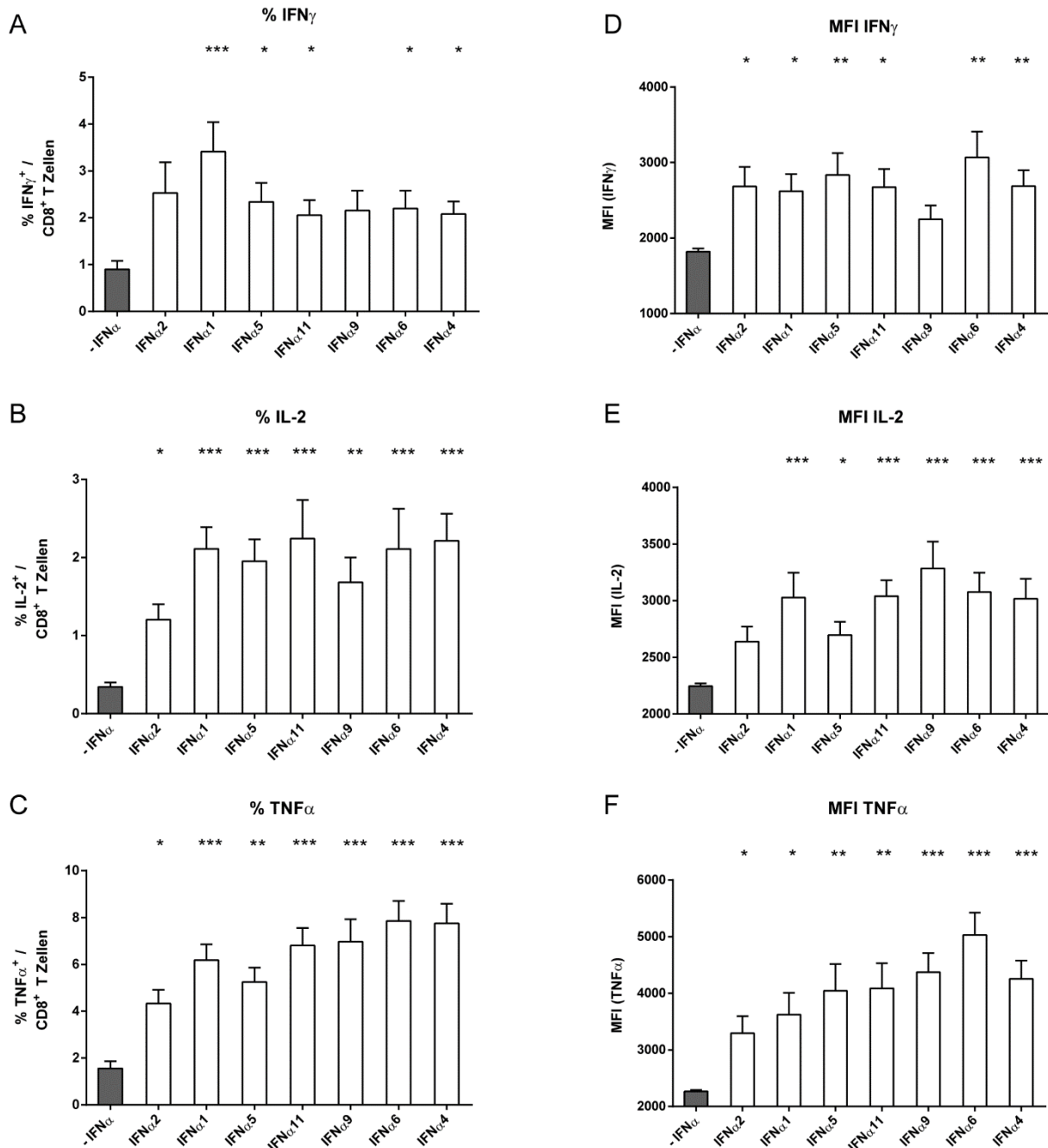


Abb. 4-4 Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion bezüglich der Expression von IFN γ , IL-2 und TNF α in IFN α Subtyp-behandelten CD8 $^{+}$ T Zellen.

CD8 $^{+}$ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). Die intrazelluläre Produktion von IFN γ , IL-2 und TNF α in CD8 $^{+}$ T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die prozentualen Anteile (A) IFN γ -, (B) IL-2- und (C) TNF α -produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen und die quantitative Expression an (D) IFN γ , (E) IL-2 und (F) TNF α , gemessen als MFI, sind gezeigt. Die Mittelwerte (+SEM) von n=15 Experimenten sind als Balken in antiproliferativer Reihenfolge dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Ordinary One Way ANOVA* oder den *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für p < 0,05; ** für p < 0,01; *** für p < 0,001 angezeigt.

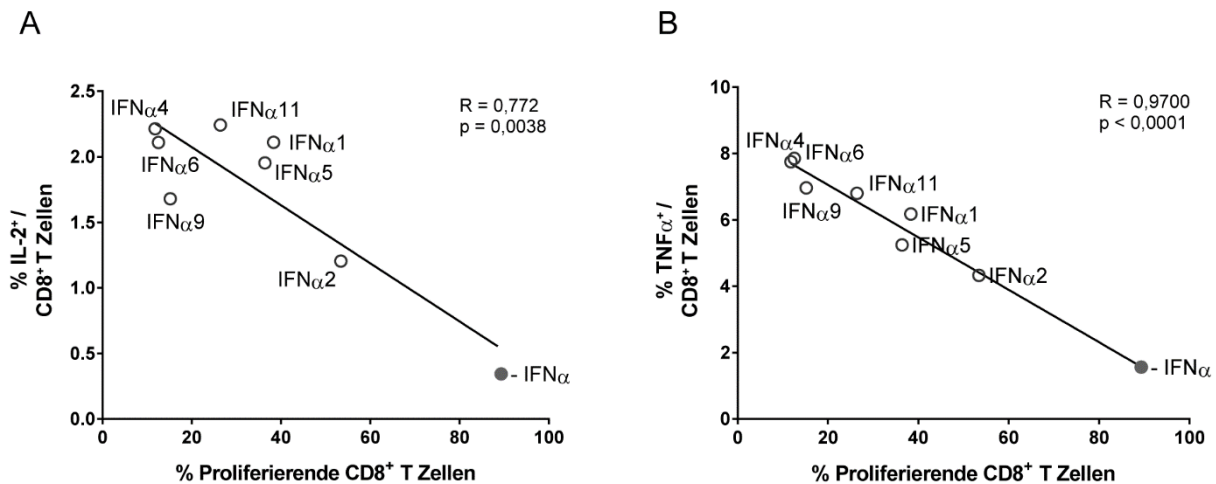


Abb. 4-5 Korrelation des antiproliferativen Effekts und der Induktion von IL-2- und TNFα-produzierender CD8⁺ T Zellen nach IFNα Subtyp Stimulation.

Korrelation zwischen Proliferation und (A) IL-2 bzw. (B) TNFα Produktion in CD8⁺ T Zellen. Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen sind als offene Kreise (IFNα Subtyp stimuliert) und ausgefüllten Kreis (unbehandelt) dargestellt. Statistisch signifikante Korrelationen wurden mit dem *Pearson correlation test* analysiert, die Ergebnisse sind im Graphen dargestellt.

4.1.3 Der antiproliferative Effekt und die Verbesserung der Effektor CD8⁺ T Zellfunktionen durch IFNα Subtypen sind konzentrations- und zeitabhängig

Um zu überprüfen, ob der antiproliferative Effekt der IFNα Subtypen konzentrationsabhängig ist, wurden CD8⁺ T Zellen, wie in 4.1 beschrieben, mit DCs ausgesät und mit unterschiedlichen IFNα Subtyp Konzentrationen stimuliert. Nach 72 h wurde die Proliferation, wie auch die Expression von GzmB (MFI), IFNγ, IL-2 und TNFα (jeweils %) bei unterschiedlichen IFNα Subtyp-Konzentrationen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-6 gezeigt.

IFNα4 reduzierte die Proliferation der CD8⁺ T Zellen konzentrationsabhängig. Bereits ab 50 Units pro Well war ein antiproliferativer Effekt erkennbar. Schon mit 72 Units IFNα4 (± 103 Units) konnte die Proliferation auf die Hälfte reduziert werden, womit die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) von IFNα4 bei ca. 70 Units/Well lag (Abb. 4-6 B). Auch die anderen getesteten IFNα Subtypen reduzierten die Proliferation konzentrationsabhängig. Die IC₅₀ Werte bestätigen die unterschiedliche antiproliferative Aktivität der Subtypen, was bereits im Proliferationstest beobachtet wurde (vgl. Abb. 4-1 B). So waren 1175 Units IFNα2/Well nötig, um die Proliferation

um 50 % zu inhibieren. Bei allen anderen Subtypen lag der IC₅₀ Wert deutlich niedriger (IFN α 5: 750 Units/Well; IFN α 6: 70 Units/Well; IFN α 9: 40 Units/Well).

Im Hinblick auf die hervorgerufene Produktion von GzmB (MFI, Abb. 4-6 C) und der intrazellulären Zytokine (%; Abb. 4-6 D-F) wurden ähnliche Ergebnisse gemessen und deren Expression hing ebenfalls von der IFN α 4 Konzentration ab. So erhöhte die Stimulation mit geringen Konzentrationen an IFN α 4 die Expression von GzmB, IL-2 und TNF α . Die Expression von GzmB steigerte sich bereits um 50 % bei der Verwendung von 300 Units IFN α 4 pro Well. Der Anteil IL-2-produzierender CD8⁺ T Zellen konnte durch 100 Units fast vervierfacht werden. Nur der Anteil IFN γ -produzierender CD8⁺ T Zellen konnte erst ab höheren Konzentrationen IFN α 4 gesteigert werden - eine Verdopplung war erst mit 500 Units möglich. Daher wurde für alle weiteren Experimente eine mittlere Konzentration von 500 Units/Well verwendet. Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass sowohl der antiproliferative Effekt, als auch die Induktion des CD8⁺ T Zell Effektorphänotyps, abhängig von der Konzentration des verwendeten IFN α Subtyps waren.

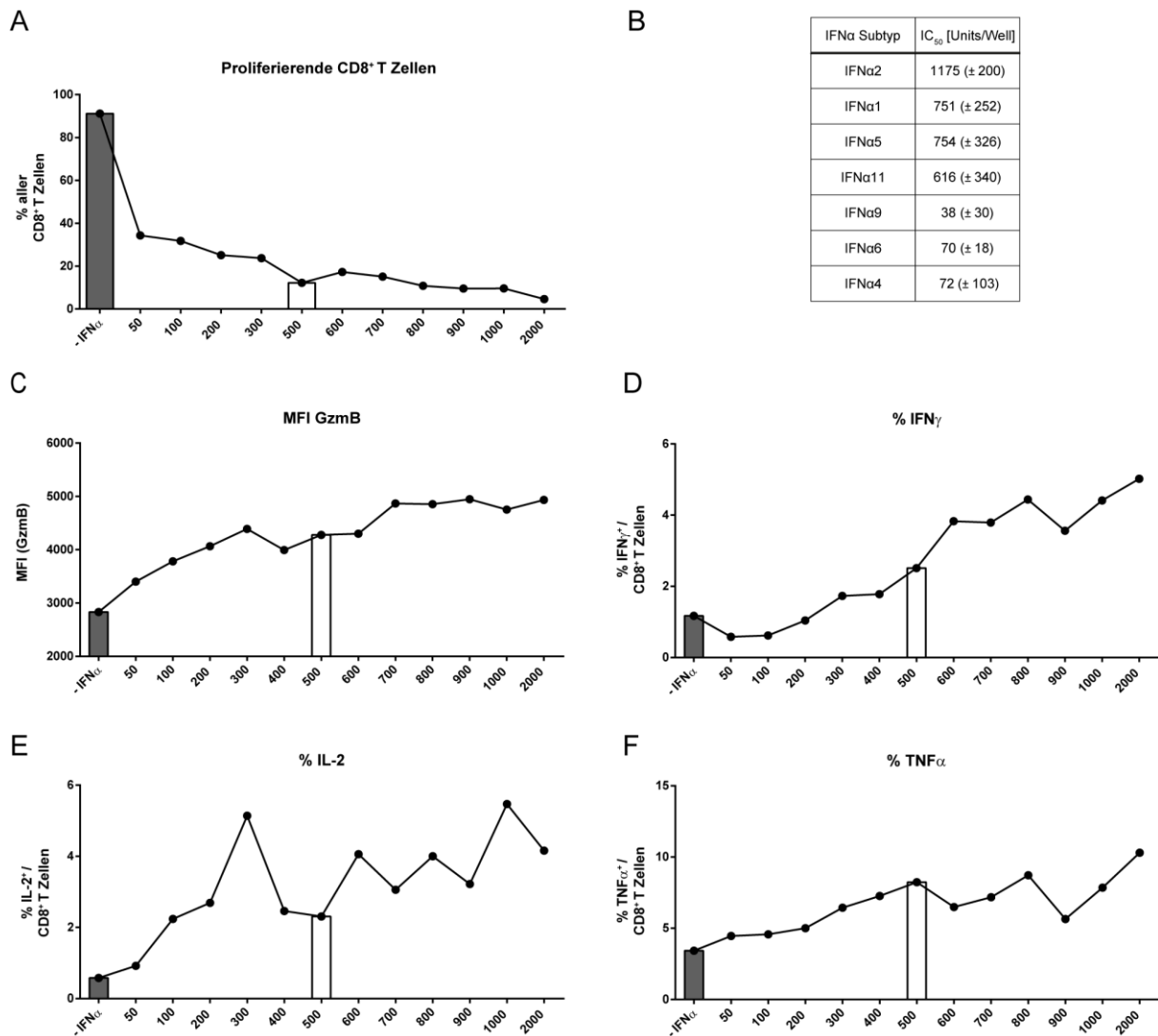


Abb. 4-6 Proliferation und Expression von GzmB, IFN_γ, IL-2 und TNFα in Abhängigkeit der IFNα Konzentration.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h mit unterschiedlichen IFNα Subtyp Konzentrationen/Well co-kultiviert. Der graue Balken stellt die unbehandelte Kontrolle dar, der weiße Balken die in allen Proliferationstests verwendete Konzentration von 500 Units/Well. Die (A) Proliferation in Abhängigkeit der IFNα4 Konzentration wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. (B) Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀), die die Proliferation auf die Hälfte reduzierte, ist für alle IFNα Subtypen tabellarisch dargestellt. Die intrazelluläre Produktion von (C) GzmB gemessen als MFI, sowie der Anteil (D) IFN_γ-, (E) IL-2- und (F) TNFα-produzierender CD8⁺ T Zellen nach IFNα4 Stimulation wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt (n=2).

Als nächstes sollte überprüft werden, ob der antiproliferative Effekt bzw. die Induktion der Effektorfunktionen in CD8⁺ T Zellen zeitabhängig waren. Daher wurden CD8⁺ T Zellen, wie in 4.1 beschrieben, mit DCs ausgesät und nach 24, 48 und 72 h sowohl der Anteil proliferierender CD8⁺ T Zellen als auch die Expression von GzmB und von den Zytokinen gemessen (Abb. 4-7).

Nach 24 h war zunächst weder bei der unbehandelten Kontrolle, noch bei den IFN α Subtyp-stimulierten Zellen eine Proliferation der CD8 $^{+}$ T Zellen messbar (Abb. 4-7 A). Erst nach 48 h proliferierten die CD8 $^{+}$ T Zellen in der Abwesenheit von IFN α (70 % aller CD8 $^{+}$ T Zellen). Nach 72 h hatten sich bereits fast alle CD8 $^{+}$ T Zellen geteilt (92 %). Der antiproliferative Effekt der IFN α Subtypen war bereits nach 48 h messbar und in allen Gruppen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle erkennbar.

Sowohl der Anteil GzmB-produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen, als auch die Menge an GzmB, gemessen als MFI, steigerte sich mit der Zeit (Abb. 4-7 B+C). Obwohl, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle, bei den IFN α Subtyp stimulierten CD8 $^{+}$ T Zellen ein größerer Anteil schon nach 24 h GzmB produzierte, glich sich dieses Verhältnis nach 48 und 72 h an und sowohl unstimulierte als auch IFN α Subtyp-stimulierte CD8 $^{+}$ T Zellen exprimierten GzmB. Hinsichtlich der quantitativen Menge an GzmB innerhalb der CD8 $^{+}$ T Zelle (MFI) war zwischen den unbehandelten und IFN α Subtyp-stimulierten Zellen erst nach 72 h ein Unterschied messbar (Abb. 4-7 B).

Ähnliche Ergebnisse konnte man bezüglich der prozentualen Anteile IL-2- und IFN γ -produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen beobachten. Der Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und den IFN α Subtyp-stimulierten CD8 $^{+}$ T Zellen war allerdings bereits nach 48 h messbar (Abb. 4-7 D+E). Im Gegensatz dazu hatte der Anteil TNF α -produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen seinen Höhepunkt bereits schon 24 h nachdem die Zellen co-kultiviert wurden (Abb. 4-7 F) und wurde durch IFN α Subtyp Stimulation auf bis zu 20 % erhöht, womit dieser deutlich höher lag, als der der unstimulierten Kontrolle (13 %).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der antiproliferative Effekt positiv mit der IFN α Subtyp Konzentration korrelierte und der Effekt im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mit der Zeit deutlicher ausgeprägt war. Gleiches galt für die Induktion von GzmB, IFN γ und IL-2. Die Induktion von TNF α war ebenfalls abhängig von der Konzentration des IFN α Subtyps, allerdings war das Maximum an TNF α -produzierenden CD8 $^{+}$ T Zellen bereits nach 24 h erreicht.

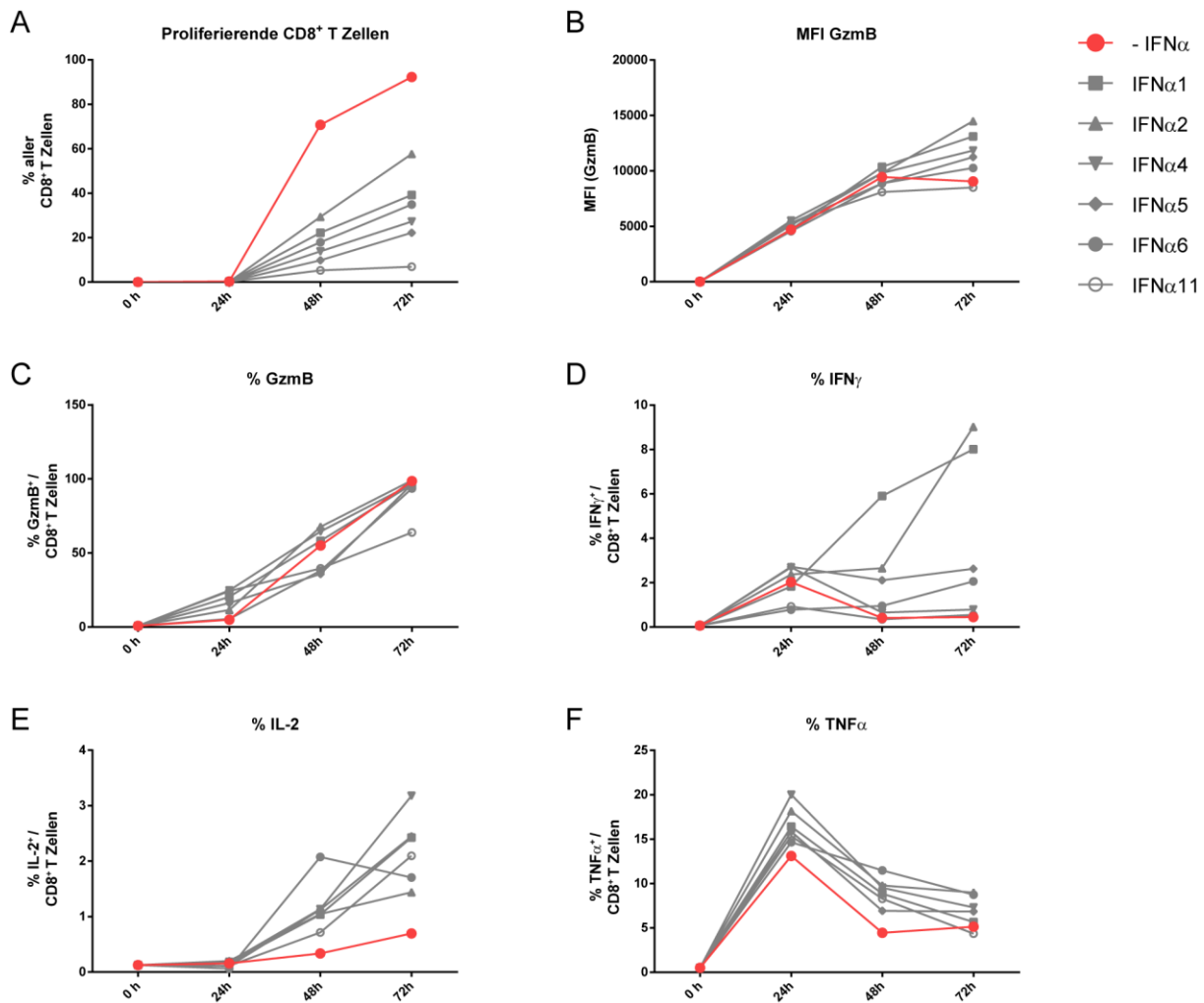


Abb. 4-7 Kinetik der Proliferation und Expression von GzmB, IFN γ , IL-2 und TNF α in CD8⁺ T Zellen nach IFN α Subtyp Behandlung.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT anfärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). (A) Die Proliferation, sowie die intrazelluläre Produktion von (B) GzmB (MFI), sowie die prozentualen Anteile (C) GzmB-, (D) IFN γ -, (E) IL-2- und (F) TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Mittelwerte von n=2 Experimenten sind angezeigt.

4.1.4 Verbesserte Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation

Nach Aktivierung und Differenzierung von naiven zu zytotoxischen CD8⁺ T Zellen, sind diese dazu in der Lage virusinfizierte oder transformierte Zellen anhand prozessierter Antigene, die über MHC-I präsentiert werden, zu erkennen und anschließend über molekulare Mechanismen zu eliminieren [101, 201]. Ein Effektormolekül für die CD8⁺ T Zell-vermittelte Zytotoxizität ist GzmB. Da in den vorherigen Experimenten die IFN α Subtyp-stimulierten CD8⁺ T Zellen eine

gesteigerte GzmB Expression zeigten, sollte als nächstes untersucht werden, ob tatsächlich die zytotoxische Aktivität dieser Zellen gesteigert war. Dafür wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätstest durchgeführt, der es ermöglichte, die spezifische Eliminierung von Zielzellen durch CD8⁺ T Zellen zu untersuchen. Der *in vitro* Zytotoxizitätstest verläuft nach dem Prinzip des Proliferationstests: CD8⁺ T Zellen wurden, wie in 4.1 beschrieben, mit DCs ausgesät und für 24 h co-kultiviert. Als Zielzellen wurden FBL-3 Zellen verwendet, eine FV-transformierte Zelllinie, die FV-Antigene auf ihrer Oberfläche präsentiert. Diese Zielzellen wurden mit CFSE gefärbt und nach 24 h zu der Co-Kultur hinzugefügt, wodurch sie von CD8⁺ T Zellen erkannt und eliminiert werden konnten.

Wie in Abb. 4-8 zu sehen ist, wurden in Abwesenheit von IFN α 21 % der FBL-3 Zellen von CD8⁺ T Zellen getötet. Die vorherige Stimulation der CD8⁺ T Zellen mit IFN α 4 und IFN α 6 erhöhte den Anteil der abgetöteten FBL-3 Zellen signifikant um das 3-fache und lag in beiden Fällen bei 63 %. Die Stimulation mit IFN α 9 und IFN α 2 erzielte ähnliche Ergebnisse. Nur die Subtypen IFN α 1, IFN α 5 oder IFN α 11 verbesserten das Abtöten der Zielzellen nur gering und führten nicht zu einem signifikanten Unterschied. Um ausschließen zu können, dass die Stimulation mit IFN α Subtypen einen direkten Effekt auf die FBL-3 Zellen und deren Eliminierung hatte, wurde als Kontrolle ein Ansatz mit Peptid-unbeladenen DCs mitgeführt. Es kam zu keiner Eliminierung der Zielzellen (Daten nicht gezeigt).

Die Stimulation mit bestimmten IFN α Subtypen verbesserte demnach die Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen.

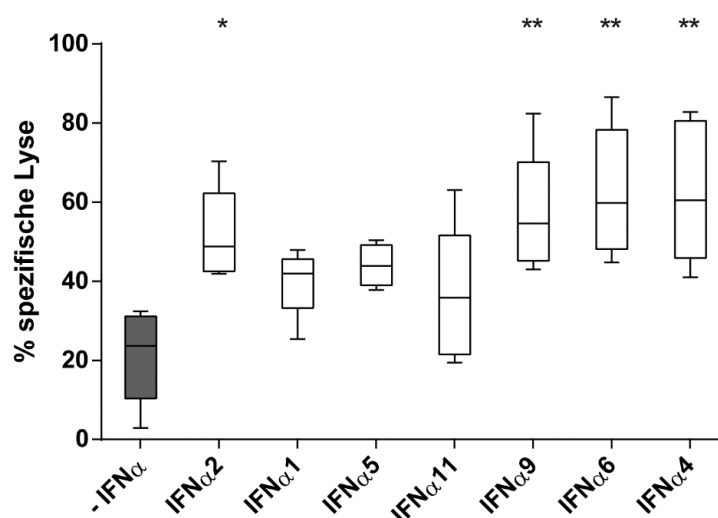


Abb. 4-8 Analyse der Zytotoxizität von IFN α -stimulierten CD8⁺ T Zellen.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 24 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). FBL-3 Zielzellen wurden mit CFSE angefärbt und in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 1:1 zu der Co-Kultur hinzugefügt und für weitere 24 h inkubiert. Der Anteil getöteter Zellen wurde durch die Zugabe von 7-AAD bestimmt, wodurch tote Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden konnten. Die Ergebnisse von n=5 Experimenten sind im Boxplot-Diagramm in antiproliferativer Reihenfolge dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ angezeigt.

4.1.5 IFN α Subtyp-induzierte immunmodulatorische Effekte auf CD8⁺ T Zellen sind antigen-unspezifisch

Die biologische Rolle von verschiedenen IFN α Subtypen wurde schon in vielen *in vitro* und *in vivo* Modellen untersucht. Hier hat man festgestellt, dass die jeweiligen Subtypen spezifische aber unterschiedliche Funktionen haben, die von der vorliegenden Virusinfektion abhängig sind [66]. Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob die vorher beobachteten Effekte der IFN α Subtypen Antigen-spezifisch sind. Dafür wurden zwei weitere Proliferationstests durchgeführt, bei denen entweder CD8⁺ T Zellen verwendet wurden, die spezifisch für ein MHC-I-restringiertes Epitop des Hämagglutinin (HA) Peptids des Influenzavirus A sind oder CD8⁺ T Zellen, die spezifisch ein MHC-I-restringiertes Epitop des Ovalbumin (Ova) Peptids erkennen. Zur Stimulation wurden die drei IFN α Subtypen (IFN α 4, IFN α 6 und IFN α 9) ausgesucht, die die stärkste antiproliferative Kapazität im FV-spezifischen Proliferationstest aufwiesen und zusätzlich den CD8⁺ T Zell-Effektorphänotyp besonders stark verbesserten. Die Ergebnisse des HA-spezifischen Proliferationstests sind in der Abb. 4-9 und die des Ova-spezifischen Proliferationstests in der Abb. 4-10 gezeigt.

Nach Antigen-spezifischer Aktivierung zeigten die Influenza-spezifischen HA TCRtg CD8⁺ T Zellen eine starke Proliferationskapazität, die bis zu 99 % proliferierende CD8⁺ T Zellen zeigte (Abb. 4-9 A). Nach Stimulation mit 500 Units/Well der Subtypen IFN α 4 (66 %), IFN α 6 (62 %) und IFN α 9 (42 %) war die CD8⁺ T Zellproliferation signifikant reduziert. Dabei stimmte die Reihenfolge der IFN α Subtypen bezüglich ihrer antiproliferativen Kapazität mit den Ergebnissen aus dem FV-spezifischen Proliferationstest überein (Abb. 4-1 B) - mit IFN α 4 als stärkstem antiproliferativen IFN α Subtyp, gefolgt von IFN α 6 und IFN α 9.

Wie im FV-spezifischen Proliferationstest konnte auch in HA TCRtg CD8⁺ T Zellen die Produktion von GzmB sowie die intrazelluläre Zytokinproduktion von IFN γ , IL-2 und TNF α durch IFN α Stimulation signifikant erhöht werden. Sowohl der prozentuale Anteil GzmB-produzierender HA TCRtg CD8⁺ T Zellen stieg nach Stimulation mit allen drei IFN α Subtypen an, als auch die exprimierte Menge an GzmB (MFI) (Abb. 4-9 B). Außerdem wurde die intrazelluläre Zytokinproduktion durch die Stimulation mit den IFN α Subtypen erhöht. Sowohl die prozentualen Anteile IFN γ -, IL-2 und TNF α -produzierender HA CD8⁺ T Zellen, als auch deren Expression (MFI) konnte durch die Stimulation mit allen drei IFN α Subtypen signifikant erhöht werden (Abb. 4-9 C-E). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen der antiproliferativen Kapazität der IFN α Subtypen und dem Anteil TNF α -produzierender HA-spezifischer CD8⁺ T Zellen bestand (Abb. 4-11)

Ähnliche Ergebnisse wurden im Ova-spezifischen Proliferationstest gemessen (Abb. 4-10 A-E). Hier war der antiproliferative Effekt auf die CD8⁺ T Zellproliferation zwar etwas stärker, als im Influenza-spezifischen Proliferationstest, die Wirkung auf die Effektorfunktionen fiel hingegen geringer aus.

Die Korrelation zwischen der antiproliferativen Kapazität der IFN α Subtypen und dem Anteil TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen war in den drei Antigen-spezifischen Proliferationstests sehr unterschiedlich (Abb. 4-11). Während ein signifikanter Zusammenhang zwischen CD8⁺ T Zellproliferation und TNF α Induktion im FV- und Influenzaspezifischen Proliferationstest messbar war, sah man im Ova-spezifischen Proliferationstest diesbezüglich keinen Effekt. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass die antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekte der IFN α Subtypen in Proliferationstests mit unterschiedlichen Antigenen vergleichbar und somit antigen-unspezifisch waren.

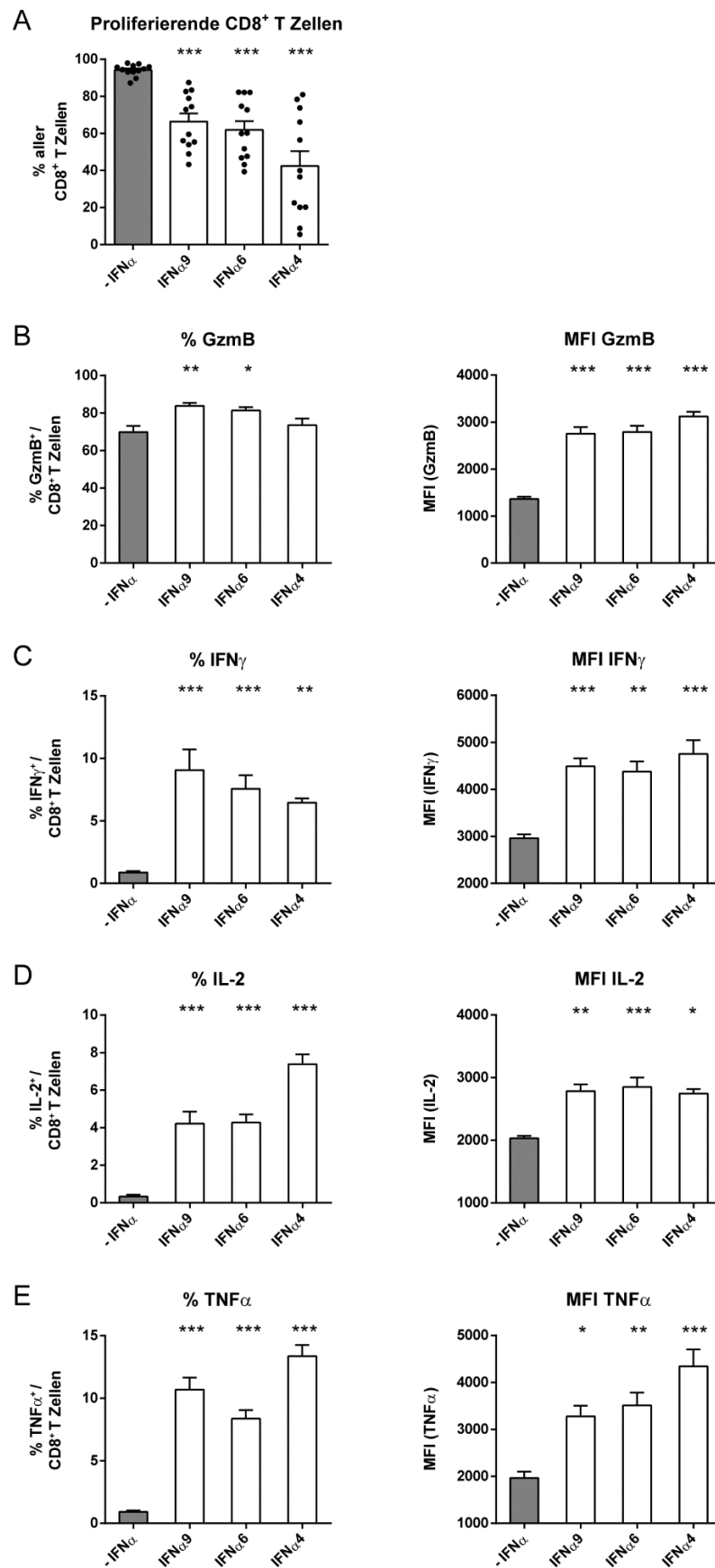


Abb. 4-9 Untersuchung der Proliferation und intrazellulären Zytokinproduktion in IFN α Subtyp-stimulierten Influenza-spezifischen CD8⁺ T Zellen.

CD8⁺ T Zellen wurden aus HA TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem HA Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). (A) Die CD8⁺ T Zellproliferation wurde als Verlust des fluoreszierenden Zellfarbstoffs VT durchflusszytometrisch gemessen und der Anteil proliferierender CD8⁺ T Zellen sind als Mittelwerte (+SEM) von n=12 Experimenten als Balken in antiproliferativer Reihenfolge angezeigt. Die intrazelluläre Produktion von (B) GzmB, (C) IFN γ , (D) IL-2 und (E) TNF α in CD8⁺ T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die prozentualen Anteile Zytokin-produzierender CD8⁺ T Zellen (%; linke Abb.) und die quantitative Menge an gebildeten GzmB und Zytokinen (MFI, rechte Abb.) sind als Mittelwerte (+SEM) von n=12 Experimenten als Balken angezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Ordinary One Way ANOVA* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$ angezeigt.

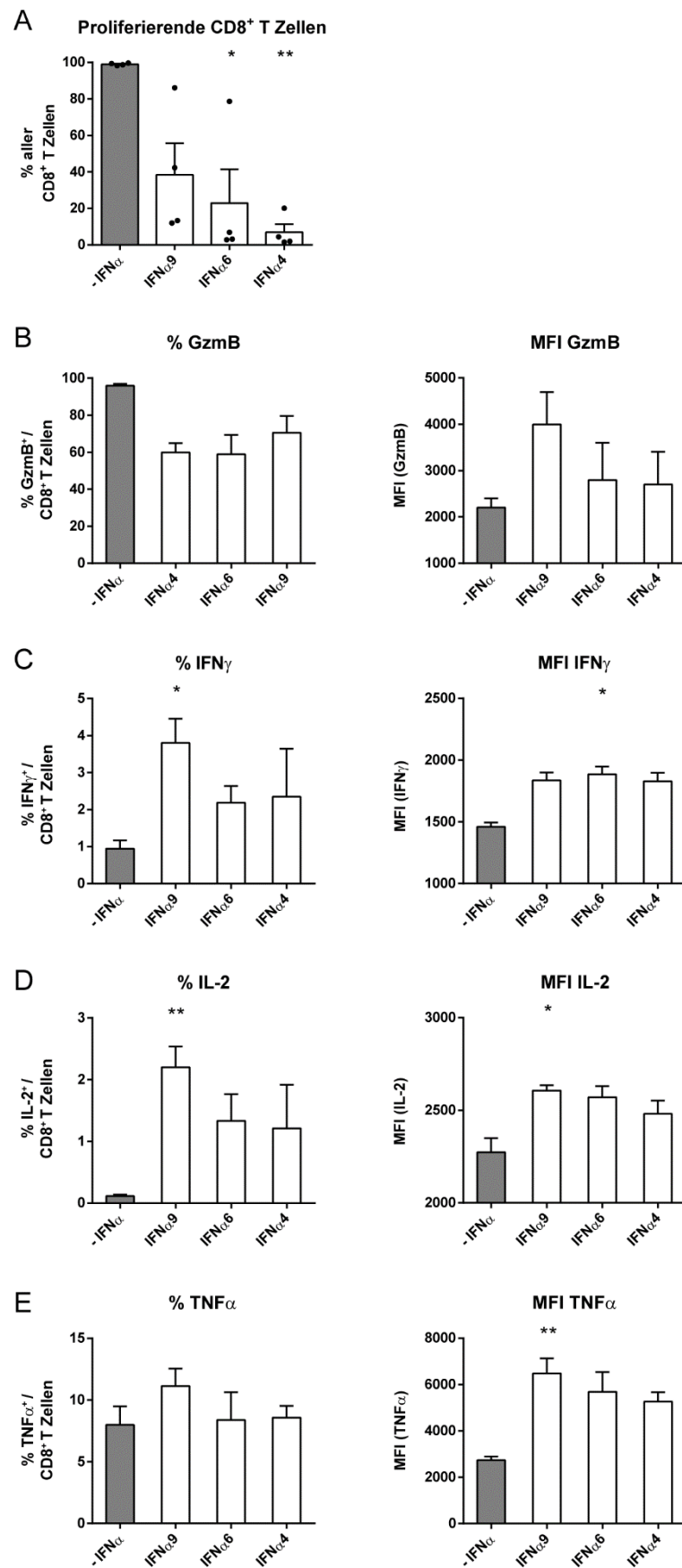


Abb. 4-10 Untersuchung der Proliferation und intrazellulären Zytokinproduktion in IFN α Subtyp-stimulierten OT I CD8⁺ T Zellen.

CD8⁺ T Zellen wurden aus OT I Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem Ova Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (± 500 Units IFN α Subtyp/Well). (A) Die CD8⁺ T Zellproliferation wurde als Verlust des fluoreszierenden Zellfarbstoffs VT durchflusszytometrisch gemessen und der Anteil proliferierender CD8⁺ T Zellen sind als Mittelwerte mit Standardabweichung von n=12 Experimenten als Balken angezeigt. Die intrazelluläre Produktion von (B) GzmB, (C) IFN γ , (D) IL-2 und (E) TNF α in CD8⁺ T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die prozentualen Anteile Zytokin-produzierender CD8⁺ T Zellen und die quantitative Menge an gebildeten GzmB und Zytokinen (MFI) sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) von n=12 Experimenten als Balken in antiproliferativer Reihenfolge angezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Ordinary One Way ANOVA* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$ angezeigt.

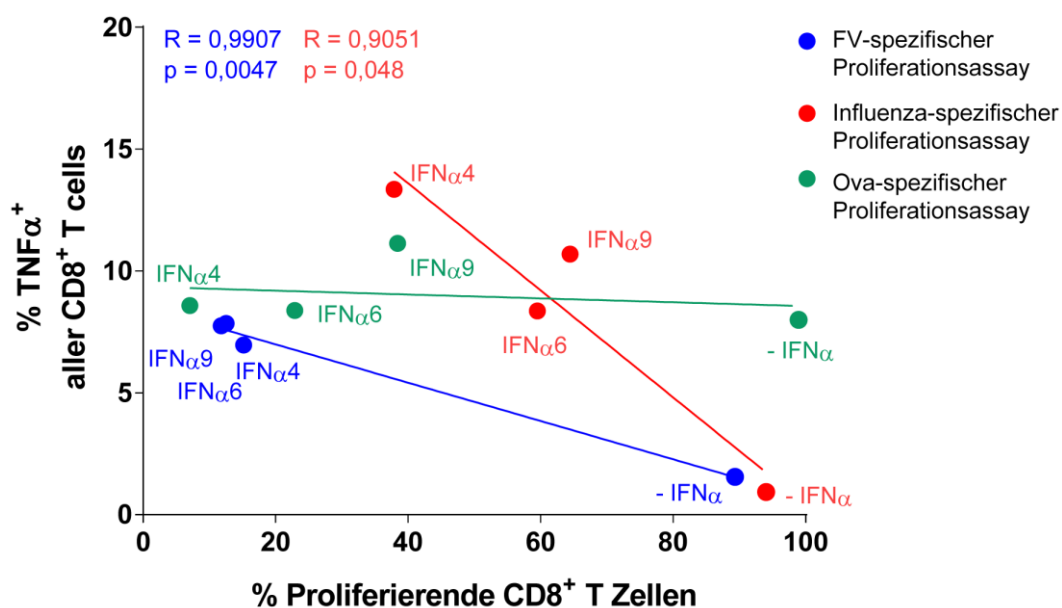


Abb. 4-11 Korrelation des antiproliferativen Effekts und der Induktion von TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation in verschiedenen Antigen-spezifischen Proliferationsassays.

Die Mittelwerte des FV-spezifischen Proliferationsassays sind als blaue, die des Influenza-spezifischen Proliferationsassays als rote und die des Ova-spezifischen Proliferationsassays als grüne Kreise dargestellt. Statistisch signifikante Korrelationen wurden mit dem *Pearson correlation test* analysiert, die Ergebnisse sind im Graphen dargestellt.

4.1.6 IFN α Subtyp Stimulation induziert die Aktivierung und Ausreifung von DCs

Da die IFN α Subtypen neben den CD8⁺ T Zellen auch direkt DCs stimulieren und so einen Einfluss auf die CD8⁺ T Zellen nehmen könnten, sollten als nächstes die DCs hinsichtlich ihrer Aktivierung, Maturierung und deren Effektorfunktionen nach Stimulation mit verschiedenen IFN α Subtypen analysiert werden. Deshalb wurde ein

FV-spezifischer Proliferationstest (siehe 4.1) durchgeführt und anschließend die Expression von verschiedenen Aktivierungs- und Maturierungsmarkern von DCs durchflusszytometrisch untersucht. DCs wurden in der Analyse gemäß ihrer Granularität und ihrer charakteristischen Oberflächenmerkmale CD11b und CD11c ausgewählt. In Abb. 4-12 ist eine repräsentative Eingrenzungsstrategie der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt.

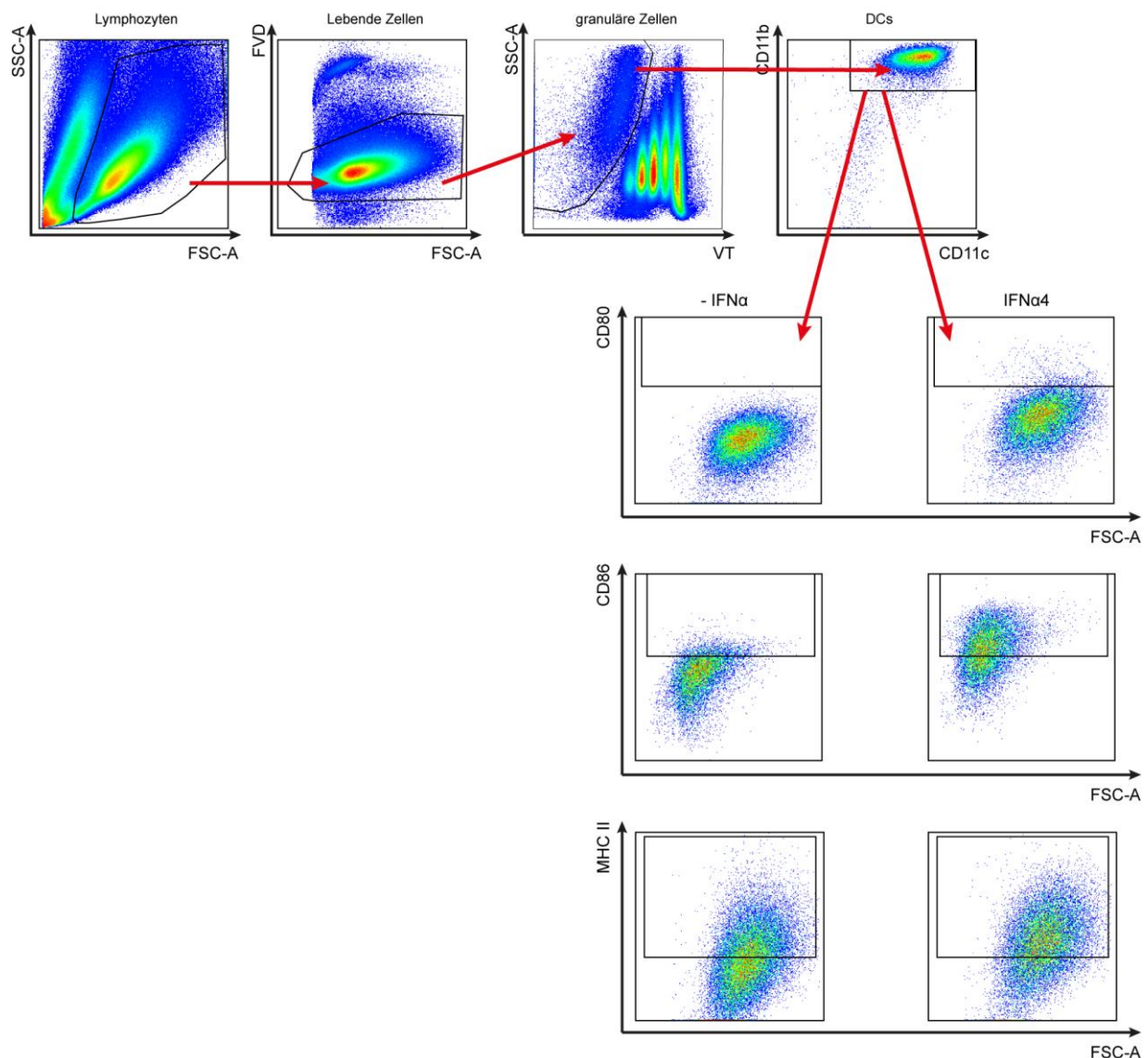


Abb. 4-12 Schematische Darstellung für die durchflusszytometrische Analyse der DCs hinsichtlich der Expression von Aktivierungs- und Maturierungsmerkmalen.

DCs wurden zunächst im *Dotplot* im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht entsprechend ihrer Größe eingegrenzt, tote Zellen wurden exkludiert und DCs wurden gemäß ihrer Granularität und ihrer charakteristischen Oberflächenmerkmale CD11b und CD11c ausgewählt. Anschließend konnte eine genaue Analyse bezüglich der Expression von Aktivierungs- (CD80 und CD86) und Maturierungsmarkern (MHC II) durchgeführt werden. Die Analyse wurde mit Hilfe der *FlowJo* Software durchgeführt.

In Abb. 4-13 A sind repräsentative Histogramme der expression von CD80, CD86 und MHC II auf DCs dargestellt. In Abwesenheit von IFN α exprimieren die peptid-beladenen DCs CD80 und MHC II auf ihrer Oberfläche (hellgrau gefärbt), allerdings konnte keine Expression von CD86 detektiert werden. Die Stimulation mit den IFN α 4 steigerte die Expression sowohl von MHC II Molekülen auf DCs, als auch die der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.

Beim Vergleich aller IFN α Subtypen konnte gezeigt werden, dass alle, außer IFN α 2, dazu in der Lage waren die Expression von CD80, gemessen als MFI, signifikant zu erhöhen (Abb. 4-13 B+C). Insbesondere die Subtypen IFN α 4 (MFI: 39958), IFN α 5 (MFI: 40398) und IFN α 9 (MFI: 50281) aktivierten die DCs am stärksten verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (MFI: 31384). Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (MFI: 19700), konnte die Expression von CD86 ebenfalls durch IFN α 4 (MFI: 34795) und IFN α 11 (MFI: 33231) besonders stark erhöht werden. Interessanterweise stieg die Expression von MHC II vergleichsweise nur geringfügig nach Stimulation mit den verschiedenen IFN α Subtypen und nur IFN α 4 und IFN α 9 erhöhten die Expression signifikant (Abb. 4-13 D). Eine signifikant positive Korrelation konnte für den Anteil TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen und der Expression von CD80 auf DCs gezeigt werden (Abb. 4-13 E).

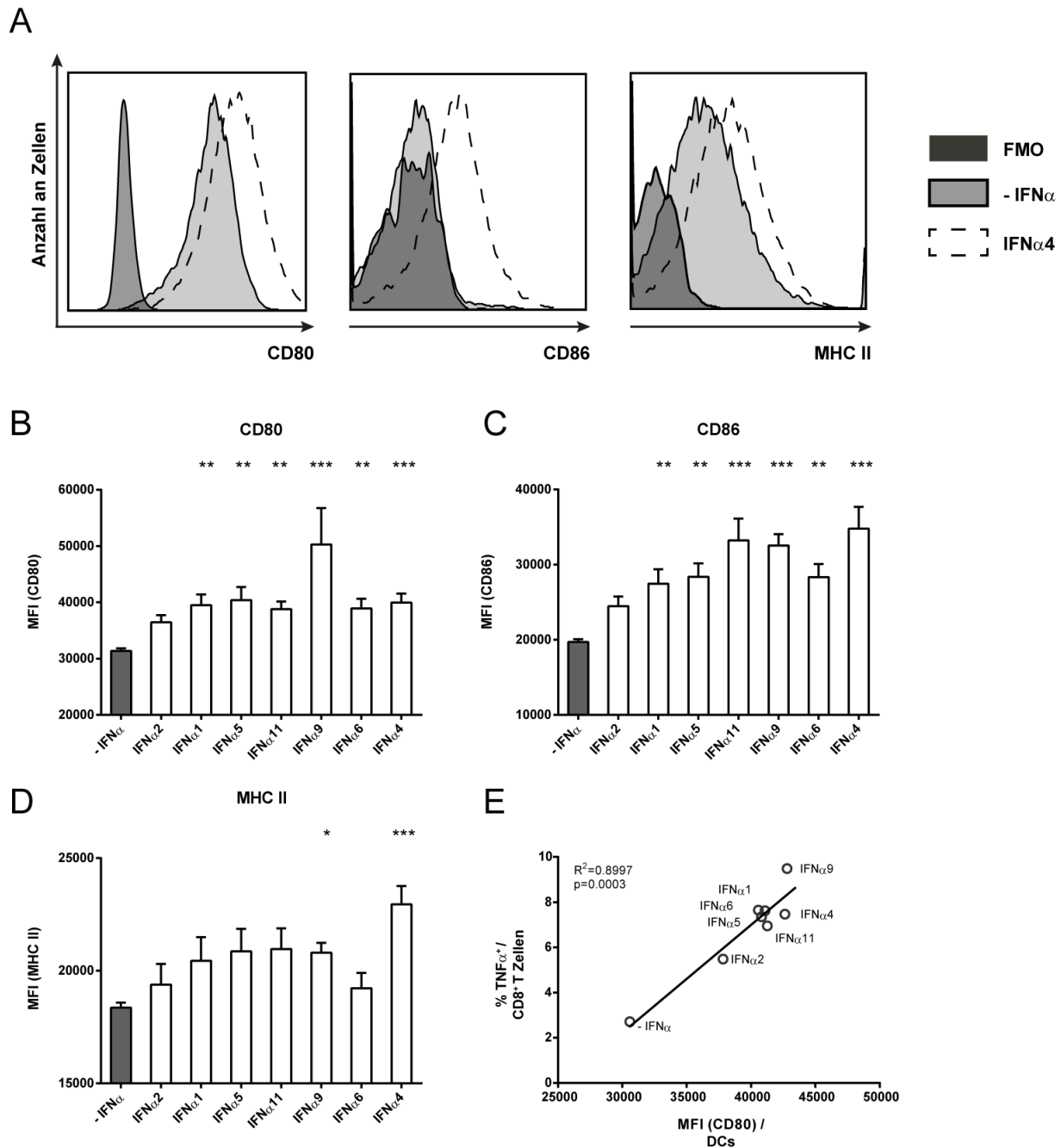


Abb. 4-13 Analyse der Aktivierung und Maturation von IFN α Subtyp-stimulierten DCs.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). Die Oberflächenexpression von den Aktivierungsmarkern CD80 und CD86 sowie des Maturierungsmarkers MHC II wurden als MFI dargestellt und quantitativ bestimmt. (A) Repräsentative Histogramme von unstimulierten und IFN α 4-stimulierten DCs sowie die Kontrolle Fluoreszenz minus eins (FMO) sind dargestellt. Die MFIs von (B) CD80, (C) CD86 und (D) MHC II sind als Mittelwerte (+SEM) von $n \geq 9$ Experimenten in antiproliferativer Reihenfolge angezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Ordinary One Way ANOVA* oder den *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$ angezeigt. (E) Die Korrelation der CD80 Expression auf DCs und dem Anteil TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen ist gezeigt. Die Mittelwerte aller Gruppen sind gezeigt. Statistisch signifikante Korrelationen wurden mit dem *Pearson correlation test* analysiert, die Ergebnisse sind im Graphen dargestellt.

Als nächstes sollte die Zytokinproduktion in der Co-Kultur nach 72 h untersucht werden. Dafür wurde mittels LEGENDplex™ und ELISA eine quantitative Analyse der Zellkulturüberstände durchgeführt, um verschiedene CD8⁺ T Zell- und DC-assoziierte Zytokine nachzuweisen (z.B. IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 and IL-12 (p70)). Hierfür wurde IFN α 4 ausgewählt, der Subtyp mit dem stärksten Effekt auf CD8⁺ T Zellen und DCs.

Sowohl IL-2 (Mittelwert: 1182 pg/ml), IFN γ (1620 pg/ml) als auch TNF α (210 pg/ml) konnten bereits in der unbehandelten Co-Kultur nachgewiesen werden (Abb. 4-14 A). Durch die Stimulation mit IFN α 4 wurden die Level dieser Zytokine deutlich erhöht (IL-2: 1345 pg/ml; IFN γ : 2450 pg/ml; TNF α : 460 pg/ml), was mit den zuvor beobachteten verbesserten Effektorfunktionen der CD8⁺ T Zellen übereinstimmte. Zusätzlich konnte IL-6 im Zellkulturüberstand gefunden werden, dessen Produktion im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle (405 pg/ml) durch die Stimulation mit IFN α 4 (2400 pg/ml) deutlich induziert wurde. Geringe Level von IL-10 (147 pg/ml) konnten ausschließlich nach IFN α 4 Zugabe hervorgerufen werden und waren in der unbehandelten Kontrolle unter der Nachweisgrenze. Weitere untersuchte Zytokine wie IL-5, IL-12(p70), IL-13, IL-4, IL-9, IL-17a/f, IL-21 oder IL-22 konnten in allen getesteten Proben nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um herauszufinden, von welchen Zellen IL-6 und IL-10 nach der Stimulation mit IFN α 4 produziert wurde, wurde die intrazelluläre IL-6 Expression nach 72 h Co-Kultur sowohl in CD8⁺ T Zellen als auch in den DCs durchflusszytometrisch untersucht. Die Menge an *IL-10* mRNA wurde mit Hilfe eines *PrimeFlow RNA*™ Assays ermittelt. Die intrazelluläre Expression von IL-6 konnte weder in unstimulierten CD8⁺ T Zellen noch in unstimulierten DCs nachgewiesen werden (Abb. 4-14 B). Nach Stimulation mit IFN α 4 stieg der Anteil IL-6-produzierender DCs allerdings erheblich an (15,7 %), die untersuchten CD8⁺ T Zellen hingegen produzierten nach wie vor kein IL-6. Auch die Stimulation mit allen anderen Subtypen induzierte die Expression von IL-6 in DCs (Daten nicht gezeigt). Die *IL-10* mRNA Expression konnte ausschließlich durch die Stimulation mit IFN α 4 in DCs geringfügig erhöht werden, aber nicht in CD8⁺ T Zellen (Abb. 4-14 C).

Diese Daten weisen darauf hin, dass durch die Stimulation mit IFN α Subtypen nicht nur die Effektorfunktionen der CD8⁺ T Zellen, sondern auch die der DCs verbessert werden. Die IFN α Behandlung führte dazu, dass DCs stärker aktiviert und maturiert wurden und verstärkt das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 exprimierten.

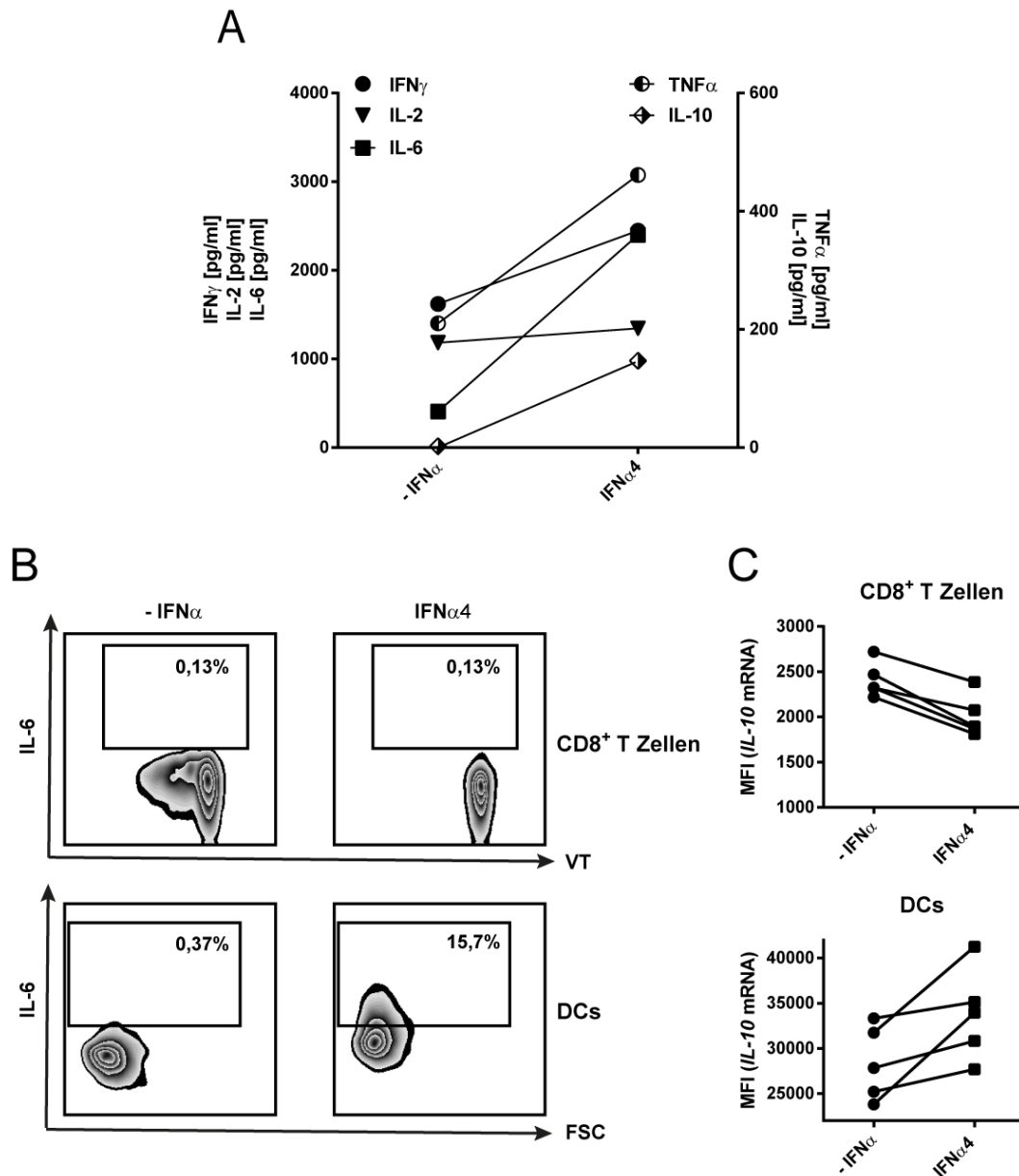


Abb. 4-14 Untersuchung der Zytokinexpressionslevel in Zellkulturüberständen von CD8⁺ T Zellen und DCs.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). (A) Die Zytokinlevel Im Co-Kulturüberstand wurden mittels LEGENDplex™ und ELISA gemessen. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte gezeigt. (B) Die intrazelluläre IL-6 Expression in CD8⁺ T Zellen und DCs wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Repräsentative *Dotplots* von unbehandelten und IFN α 4-behandelten Zellen sind gezeigt. (C) Die intrazelluläre mRNA Expression von IL-10 wurde 24 h nach Co-Kultivierung mit Hilfe des *PrimeFlow RNA*™ Assay quantifiziert und durchflusszytometrisch analysiert. MFI Werte von unbehandelten und IFN α 4-behandelten CD8⁺ T Zellen und DCs sind als Symbole und Linien dargestellt.

4.1.7 Die verbesserten Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen durch IFN α Subtyp Stimulation wird indirekt durch aktivierte DCs induziert

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die beobachteten antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekte auf CD8⁺ T Zellen direkt durch die Stimulation mit IFN α Subtypen hervorgerufen wurden, oder indirekt durch die Aktivierung von DCs. Wie in 4.1 beschrieben, wurde ein FV-spezifischer Proliferationstest durchgeführt, für den entweder CD8⁺ T Zellen oder DCs verwendet wurden, die keinen IFNAR exprimierten. Folglich konnten die verschiedenen IFN α Subtypen diese Zellen nicht stimulieren, da die IFN α -induzierten Signalwege nicht aktiviert werden können. Dadurch sollte diejenige Zellpopulation identifiziert werden, auf die die IFN α Subtypen direkt wirkten und welche für die resultierende verbesserte CD8⁺ T Zell Effektorfunktionen verantwortlich war. Erneut wurden die Subtypen IFN α 4, IFN α 6 und IFN α 9 ausgewählt, da sie die größten Effekte auf die Proliferation und Zytokinproduktion in CD8⁺ T Zellen hatten. Die Versuchsanordnung mit den vier verschiedenen Gruppen ist in Abb. 4-15 A gezeigt: IFNAR-exprimierende (WT) CD8⁺ T Zellen wurden mit WT DCs co-kultiviert (Gruppe I), welches die Positivkontrolle darstellte, da hier die IFN α Subtypen direkt auf beide Zelltypen wirken konnten. Darüber hinaus wurden IFNAR-defiziente CD8⁺ T Zellen und WT DCs (Gruppe II), sowie WT CD8⁺ T Zellen und IFNAR^{-/-} DCs (Gruppe III) miteinander co-kultiviert. Als Negativkontrolle diente die Gruppe IV bestehend aus IFNAR^{-/-} CD8⁺ T Zellen und IFNAR^{-/-} DCs, da hier die IFN α Subtypen keine der beiden Zellpopulationen stimulieren konnten.

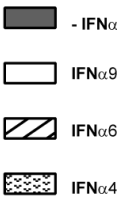
Wie bereits in Abschnitt 4.1 beschrieben wurde, führte die Stimulation mit den Subtypen IFN α 4, IFN α 6 und IFN α 9 zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation der WT CD8⁺ T Zellen (Abb. 4-15 B, Gruppe I). In Gruppe IV, wo die IFN α Subtypen weder auf CD8⁺ T Zellen noch auf DCs einen Effekt haben konnten, war der antiproliferative Effekt durch die IFN α Subtypen vollständig verschwunden. Interessanterweise konnte ein antiproliferativer Effekt nach der Stimulation mit den IFN α Subtypen in den beiden anderen Gruppen detektiert werden, also wenn eine der beiden Zellpopulationen IFNAR-defizient war (Abb. 4-15 B, Gruppe II+III). In beiden Gruppen entsprach die Stärke der jeweiligen antiproliferativen Kapazität der einzelnen IFN α Subtypen genau der, die im WT Ansatz gemessen werden konnte (Gruppe I). Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass sowohl eine

direkte IFN α Subtyp Stimulation als auch die indirekte Stimulation von DCs zu einer Suppression der CD8 $^{+}$ T Zellproliferation führte.

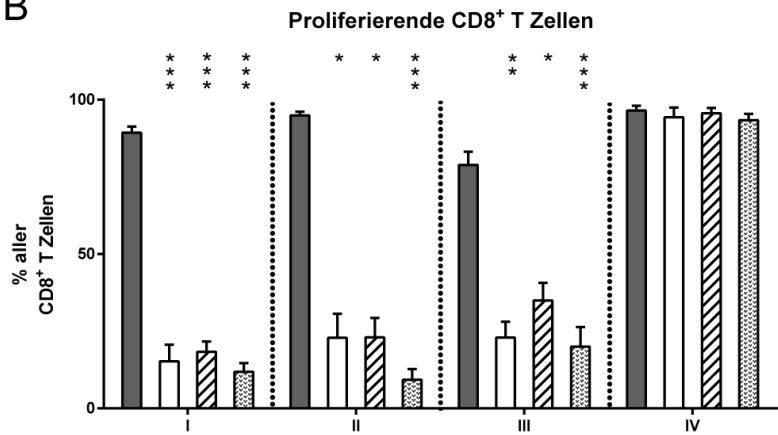
Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Aktivierung der IFN α Signalwege entweder in den CD8 $^{+}$ T Zellen oder den DCs erforderlich war, um die verbesserten Effektorfunktionen in CD8 $^{+}$ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation hervorzurufen. In Gruppe I hatte, wie zuvor gezeigt (Abb. 4-3 A), die Stimulation keinen (IFN α 4) oder nur einen supprimierenden Effekt (IFN α 6 und IFN α 9) auf den Anteil GzmB-produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen. Daher war es auch nicht verwunderlich, dass in allen anderen Gruppen die Stimulation mit den IFN α Subtypen ebenfalls keinen Effekt auf den prozentualen Anteil GzmB-produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen hatte (Abb. 4-15 C). Allerdings wurde bereits vorher mit WT Zellen gezeigt, dass die Stimulation mit den IFN α Subtypen nur einen Einfluss auf die Menge des exprimierten GzmB hatte, gemessen als MFI (Abb. 4-15 C, Gruppe I und Abb. 4-3 B). Eine Induktion der GzmB Expression blieb allerdings aus, sobald IFNAR auf CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs fehlte (Abb. 4-15 D, Gruppe IV). Interessanterweise wurde eine signifikant erhöhte GzmB Expression in IFNAR $^{-/-}$ CD8 $^{+}$ T Zellen gemessen, wenn diese mit IFN α Subtyp stimulierten WT DCs kultiviert wurden (Abb. 4-15 D, Gruppe II). Auch die Stimulation von WT CD8 $^{+}$ T Zellen, die mit IFNAR $^{-/-}$ DCs co-kultiviert wurden, rief eine erhöhte Expression von GzmB in CD8 $^{+}$ T Zellen hervor (Abb. 4-15, Gruppe III). Somit stimulierten die IFN α Subtypen sowohl direkt die GzmB Produktion in CD8 $^{+}$ T Zellen, als auch indirekt durch DCs. Des Weiteren wurden die prozentualen Anteile IFN γ -, IL-2- und TNF α -produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen untersucht. Im WT Ansatz konnten diese Anteile durch die Stimulation mit den IFN α Subtypen erhöht werden (Abb. 4-15 E-G, Gruppe I). Dieser Effekt war in Gruppe IV nicht mehr zu beobachten, da hier die CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs für IFNAR defizient waren. Interessanterweise konnte die prozentualen Anteile IFN γ -, IL-2- und TNF α -produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation auch dann nicht erhöht werden, sobald WT CD8 $^{+}$ T Zellen mit IFNAR $^{-/-}$ DCs co-kultiviert wurden (Abb. 4-15 E-G, Gruppe III). Nur IFNAR $^{-/-}$ CD8 $^{+}$ T Zellen, die mit WT DCs co-kultiviert wurden, zeigten wieder einen erhöhten Anteil Zytokin-exprimierender CD8 $^{+}$ T Zellen (Abb. 4-15 E-G, Gruppe II). Daraus konnte geschlossen werden, dass ausschließlich die Expression von IFNAR auf DCs benötigt wurde, um die Effektorfunktionen in CD8 $^{+}$ T Zellen zu verbessern.

A

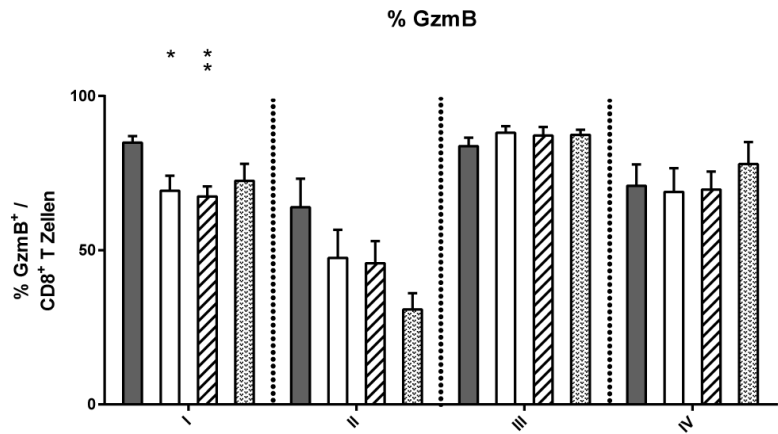
	DCs	CD8 ⁺ T Zellen
I	WT	WT
II	WT	IFNAR ^{-/-}
III	IFNAR ^{-/-}	WT
IV	IFNAR ^{-/-}	IFNAR ^{-/-}



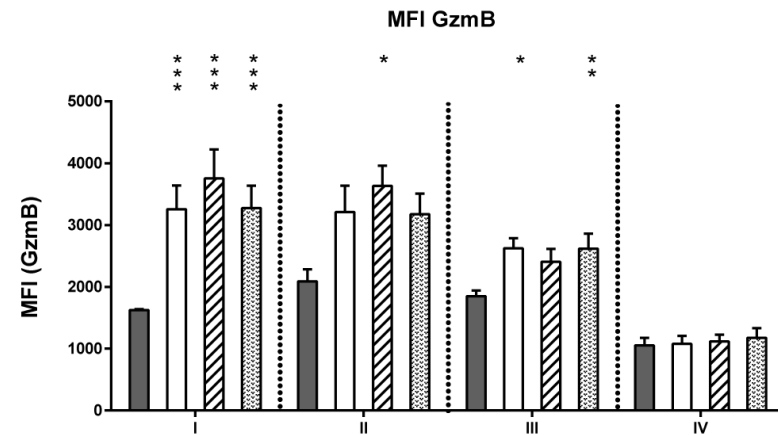
B



C



D



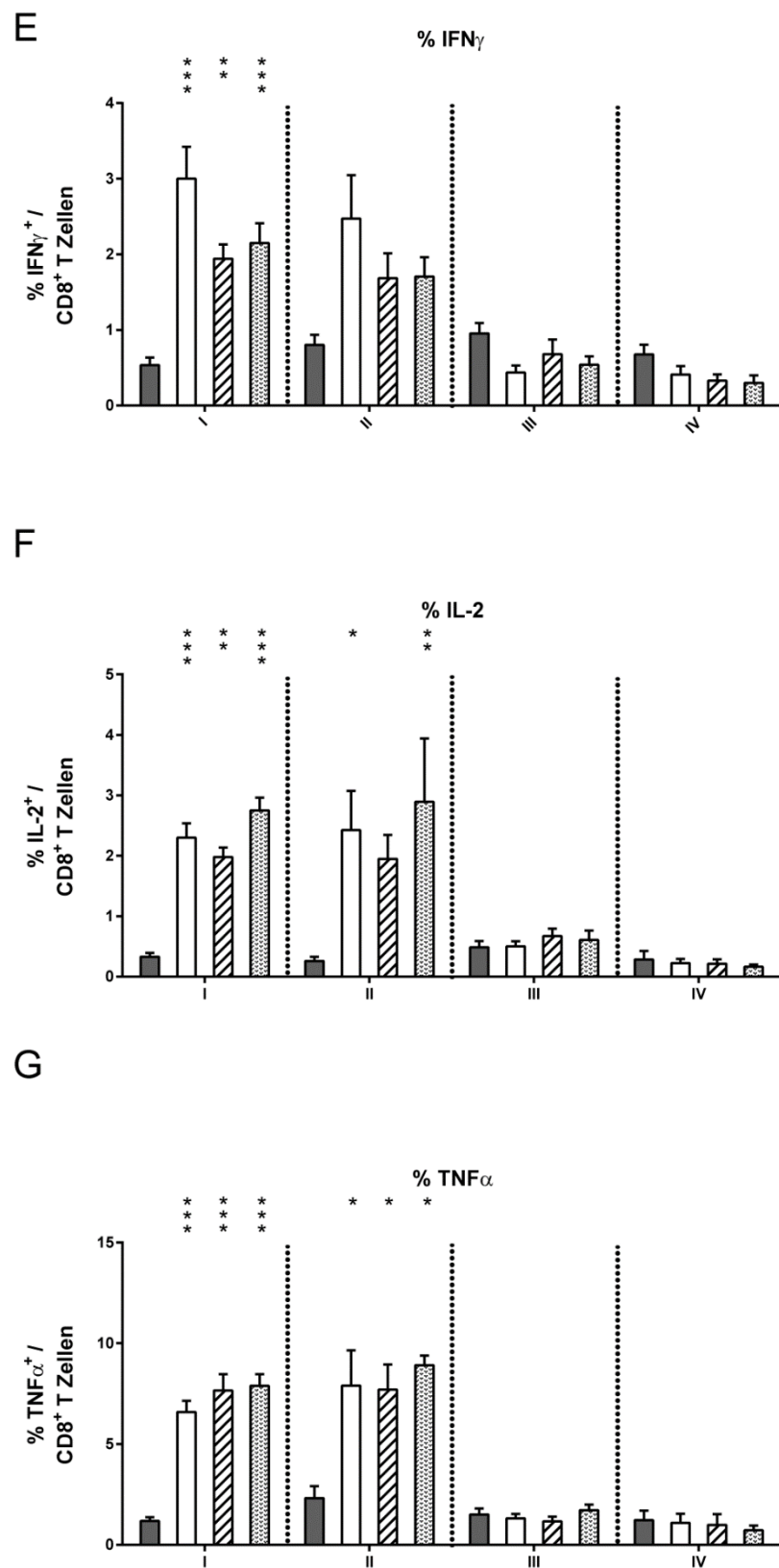


Abb. 4-15 Einfluss der IFNAR Expression auf die Proliferation von CD8⁺ T Zellen und auf die Produktion von intrazellulären Zytokinen nach Stimulation mit IFN α Subtypen.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen (WT) oder IFNAR^{-/-} FV TCRtg Mäusen (IFNAR^{-/-}) über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs (WT

oder IFNAR^{-/-}), die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 72 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). (A) Die Versuchsanordnung der verschiedenen Gruppen (I-IV) ist gezeigt. (B) Die CD8⁺ T Zellproliferation wurde als Verlust des fluoreszierenden Zellfarbstoffs VT durchflusszytometrisch gemessen. Die Anteile proliferierender CD8⁺ T Zellen sind im Boxplot gezeigt ($n \geq 6$). Die Anteile GzmB-produzierender CD8⁺ T Zellen (C), als auch die MFI von (D) GzmB, sowie die Anteile von (E) IFN γ -, (F) IL-2- (F) und (G) TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Mittelwerte sind als Balken in antiproliferativer Reihenfolge dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe innerhalb eines Ansatzes (I-IV) wurden durch einen *Ordinary One Way ANOVA* oder den *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$; *** für $p < 0,001$ angezeigt.

Schließlich sollte untersucht werden, ob die Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen direkt oder indirekt durch IFN α Subtyp Stimulation moduliert wurde. Hierfür wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätstest, wie in 4.1.4 beschrieben, erneut mit den drei IFN α Subtypen durchgeführt, die den größten Effekt in den bisherigen *in vitro* Versuchen hatten (IFN α 4, IFN α 6 und IFN α 9). Die Versuchsanordnung mit den verschiedenen Gruppen ist in Abb. 4-16 A gezeigt. Wie in 4.1.4 beschrieben, konnte die Stimulation mit verschiedenen IFN α Subtypen die Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen deutlich verbessern, wodurch das Abtöten von Zielzellen signifikant gesteigert war. Eine Verbesserung der Effektorfunktionen durch IFN α Subtypen konnte in Gruppe IV nicht mehr gemessen werden, da hier die Expression von IFNAR sowohl auf CD8⁺ T Zellen als auch DCs fehlte. Mit IFNAR^{-/-} DCs führte eine Stimulation mit den IFN α Subtypen zu einer reduzierten Eliminierung der Zielzellen durch WT CD8⁺ T Zellen (Abb. 4-16 B, Gruppe III). Nur die Expression von IFNAR auf DCs war erforderlich, um eine gesteigerte Zytotoxizität in IFNAR^{-/-} CD8⁺ T Zellen zu induzieren und deren Effektorfunktionen zu verbessern.

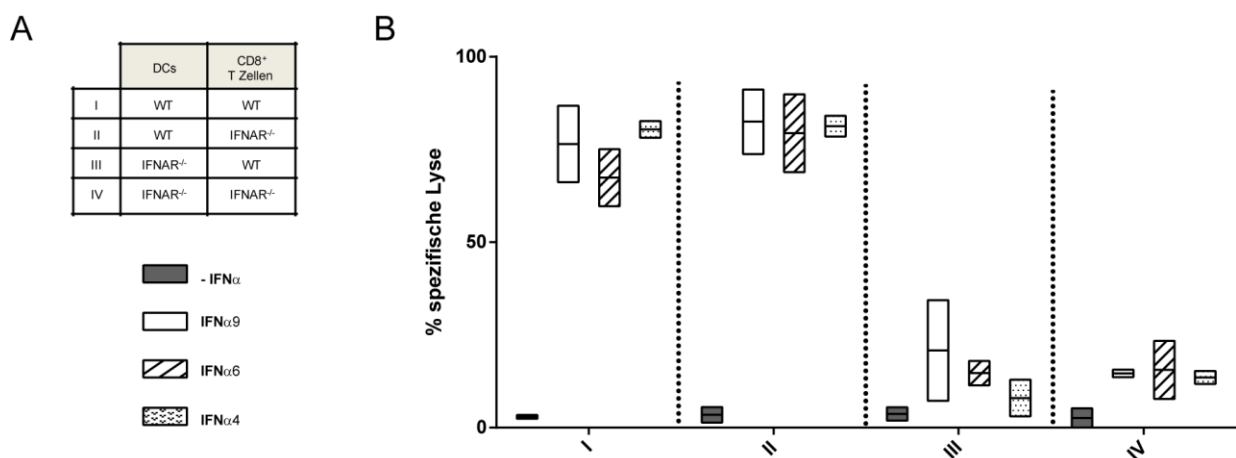


Abb. 4-16 Einfluss der IFNAR Expression auf die Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen im *in vitro* Zytotoxizitätstest.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen (WT) oder IFNAR^{-/-} FV TCRtg Mäusen (IFNAR^{-/-}) über Positivselektion isoliert, mit VT angefärbt und anschließend mit Knochenmark-generierten DCs (WT oder IFNAR^{-/-}), die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 24 h co-kultiviert (\pm 500 Units IFN α Subtyp/Well). FBL-3 Zielzellen wurden mit CFSE angefärbt und in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 1:1 zu der Co-Kultur hinzugefügt und für weitere 24 h inkubiert. Der Anteil getöteter Zellen wurde durch die Zugabe von 7-AAD bestimmt, wodurch tote Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden konnten. (A) Die Versuchsanordnung der verschiedenen Gruppen (I-IV) ist gezeigt. (B) Der Anteil eliminierter Zellen wurde durch die Zugabe von 7-AAD bestimmt, wodurch tote Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden konnten. Die Ergebnisse von n=2 Experimenten sind im Boxplot-Diagramm dargestellt.

4.1.8 IFNAR Expression auf CD8⁺ T Zellen ist notwendig für eine effiziente Eliminierung von Zielzellen *in vivo*

In dieser Arbeit konnte in *in vitro* Experimenten bereits gezeigt werden, dass die Stimulation mit IFN α Subtypen die zytotoxischen Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen verbesserte (Abb. 4-8, Abb. 4-16). Nun sollte der Einfluss von IFN α Subtypen auf CD8⁺ T Zellen *in vivo* untersucht werden. Dafür wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, für den FV TCRtg CD8⁺ T Zellen oder IFNAR^{-/-} FV TCRtg CD8⁺ T Zellen mit FV-beladenen WT DCs oder IFNAR^{-/-} DCs adoptiv in IFNAR^{-/-} Empfängermäuse transferiert worden sind (Abb. 4-17 A). Allen Mäusen wurde täglich der in den *in vitro* Experimenten stärkste antiproliferative und immunmodulatorische Subtyp IFN α 4 i.p. injiziert, beginnend am Tag des adoptiven Transfers (Tag 0). Als Kontrolle dienten WT Empfängermäuse, in die WT DCs und WT FV TCRtg CD8⁺ T Zellen transferiert worden sind und unbehandelt waren. 3 Tage nach dem adoptiven Transfer wurden aus C57BL/6 Mäusen Milzzellen isoliert, wurden mit dem FV GagL Peptid beladen und in IFNAR^{-/-} Empfängermäuse i.v. injiziert (Abb. 4-17 B). Um die Eliminierung der Peptid-beladenen Zielzellen quantifizieren zu können, wurden Zellen ohne Peptid als Kontrolle gespritzt. Um beide Populationen später durchflusszytometrisch unterscheiden zu können, wurden diese vor dem Transfer mit unterschiedlichen VT Konzentrationen angefärbt. 5 h nach Injektion der Zellen wurden die Milz und die Lymphknoten hinsichtlich der spezifischen Eliminierung der Zielzellen untersucht.

Wie bereits im *in vitro* Zytotoxizitätstest gezeigt werden konnte, konnte auch der adoptive Transfer von WT CD8⁺ T Zellen und WT DCs *in vivo* eine verstärkte Eliminierung von Zielzellen nach Behandlung mit IFN α 4 hervorrufen (Abb. 4-17 C+D, Gruppe I). Die spezifische Lyse der Zielzellen konnte sowohl in der Milz (55 %), als auch in den Lymphknoten (67 %) detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte der

adoptive Transfer von IFNAR-defizienten CD8⁺ T Zellen und DCs zu einer signifikanten Reduktion der Eliminierung von Zielzellen. In der Milz betrug die spezifische Eliminierung von Zielzellen nur noch 20 % und in den Lymphknoten 27 % (Gruppe IV), was vergleichbar zu unbehandelten WT Empfängermäusen war (ca. 35 % in der Milz und 40 % in den Lymphknoten, Daten nicht gezeigt). Ausschließlich die IFNAR Expression auf CD8⁺ T Zellen (Gruppe III) führte zu einem vergleichbaren Ergebnis wie in der Gruppe I, da auch hier eine Eliminierung der Zielzellen von 50 % in der Milz und 67 % in den Lymphknoten gemessen wurde. Der adoptive Transfer von WT DCs mit IFNAR^{-/-} CD8⁺ T Zellen (Gruppe II) führte nur teilweise zu einer gesteigerten Eliminierung der Zielzellen, die allerdings im Vergleich zur Gruppe I nicht signifikant war (Milz: 46 %; Lymphknoten: 39 %). Zusammengefasst ließ sich zeigen, dass die Expression von IFNAR auf CD8⁺ T Zellen benötigt wurde, um die zytotoxischen Effektorfunktionen nach IFN α 4 Stimulation zu verbessern.

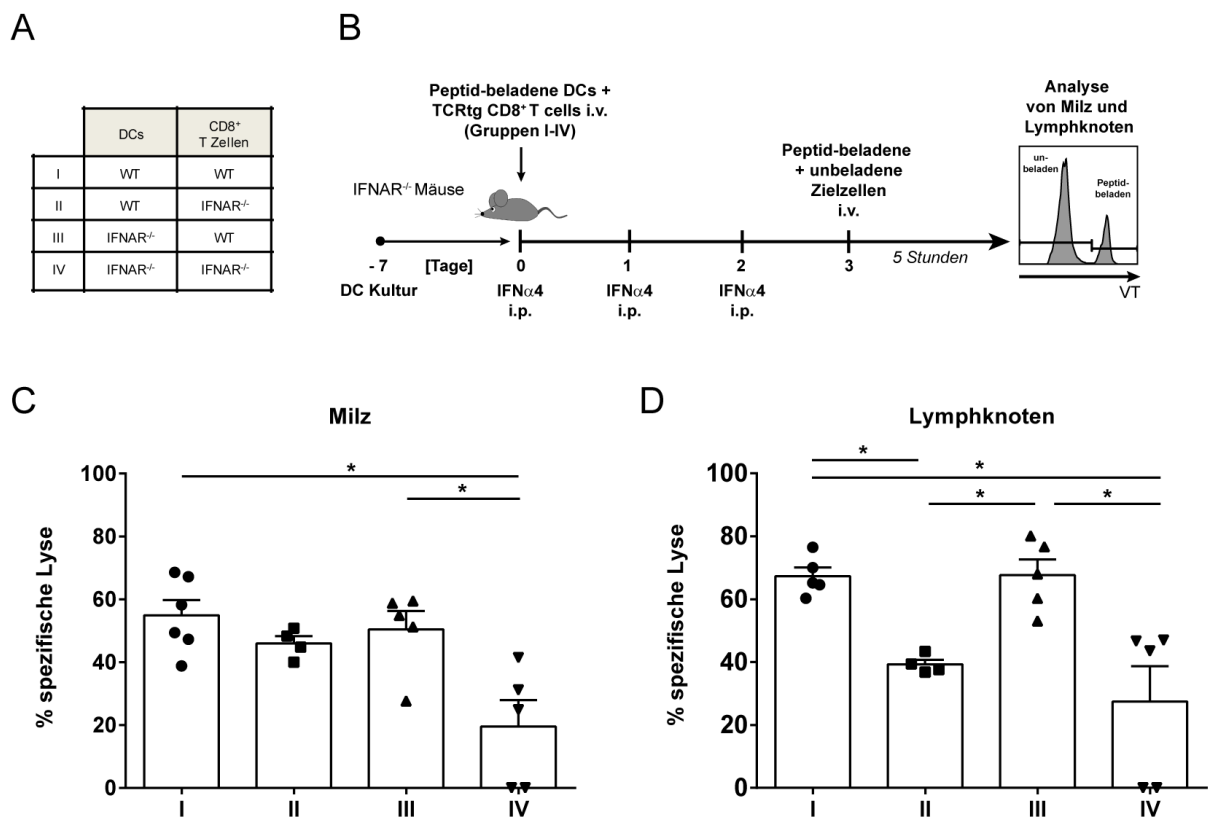


Abb. 4-17 Einfluss der IFNAR Expression auf die Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen im *in vivo* Zytotoxizitätstest.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen (WT) oder IFNAR^{-/-} FV TCRtg Mäusen (IFNAR^{-/-}) über Positivselektion isoliert und mit FV Peptid beladenen WT oder IFNAR^{-/-} DCs (Gruppe I-IV) adoptiv in IFNAR^{-/-} Mäuse transferiert. Allen Mäusen wurden täglich 8000 Units IFN α 4 i.p. injiziert, beginnend am Tag des adoptiven Transfers (Tag 0). An Tag 3 nach dem Transfer wurden peptid-beladene VT-gefärbte Zielzellen (80 μ M VT) mit unbeladenen VT-gefärbten Zellen (2 μ M) im Verhältnis von 1:1 i.v. in die IFNAR^{-/-} Rezeptormäuse injiziert. Nach 5 h wurden die Mäuse getötet und die zytotoxischen

Effektorfunktionen anhand der Eliminierungsrate von Zielzellen bestimmt. (A) Die Versuchsanordnung der verschiedenen Gruppen (I-IV) und der (B) Versuchsablauf sind gezeigt. Der prozentuale Anteil an spezifisch eliminierten Zielzellen in (C) Milz und (D) Lymphknoten sind gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mit IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$ angezeigt.

4.1.9 Schlussfolgerung

In den verschiedenen *in vitro* Experimenten wurden die immunmodulatorischen und antiproliferativen Eigenschaften der unterschiedlichen IFN α Subtypen auf CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs untersucht.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass Virus-spezifische CD8 $^{+}$ T Zellen in Abwesenheit von IFN α Subtypen durch DCs aktiviert wurden und die CD8 $^{+}$ T Zellen massiv proliferierten (Abb. 4-18). Durch die Interaktion von CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs wurden außerdem MHC II und das kostimulatorische Molekül CD80 auf der Oberfläche von DCs hochreguliert. Zudem exprimierten die CD8 $^{+}$ T Zellen GzmB, wodurch sie dazu in der Lage waren geringe Anteile an Zielzellen spezifisch zu lysieren.

Die Stimulation mit IFN α Subtypen supprimierte die Proliferation von CD8 $^{+}$ T Zellen, allerdings zeigten diese Zellen nun einen verbesserten Effektorphänotyp und die Expression des zytotoxischen Moleküls GzmB und der Effektorzytokine IFN γ , IL-2 und TNF α , die signifikant erhöht werden konnten. Dabei waren deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen messbar und es induzierten besonders die IFN α Subtypen einen starken CD8 $^{+}$ T Zell Effektorphänotyp, die auch besonders antiproliferativ wirkten. CD8 $^{+}$ T Zellen waren nach IFN α Subtyp Stimulation zudem in der Lage, Zielzellen besser zu eliminieren, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Zusätzlich stellte sich heraus, dass die *in vitro* Stimulation mit den IFN α Subtypen gesteigerte Effektorfunktionen von DCs hervorrief. Nach IFN α Subtyp Stimulation exprimierten DCs mehr MHC II, CD80 und CD86. Außerdem stieg die intrazelluläre Produktion der Zytokine IL-6 und IL-10 in DCs messbar an. Interessanterweise war die direkte Stimulation von IFNAR entweder auf CD8 $^{+}$ T Zellen oder auf DCs notwendig, um die antiproliferative Aktivität der IFN α Subtypen zu induzieren. Gleiches konnte auch für Zytotoxizität der CD8 $^{+}$ T Zellen beobachtet werden, wohingegen die verbesserten Effektorfunktionen in CD8 $^{+}$ T Zellen ausschließlich durch die IFN α Subtyp Stimulation von DCs hervorgerufen wurden.

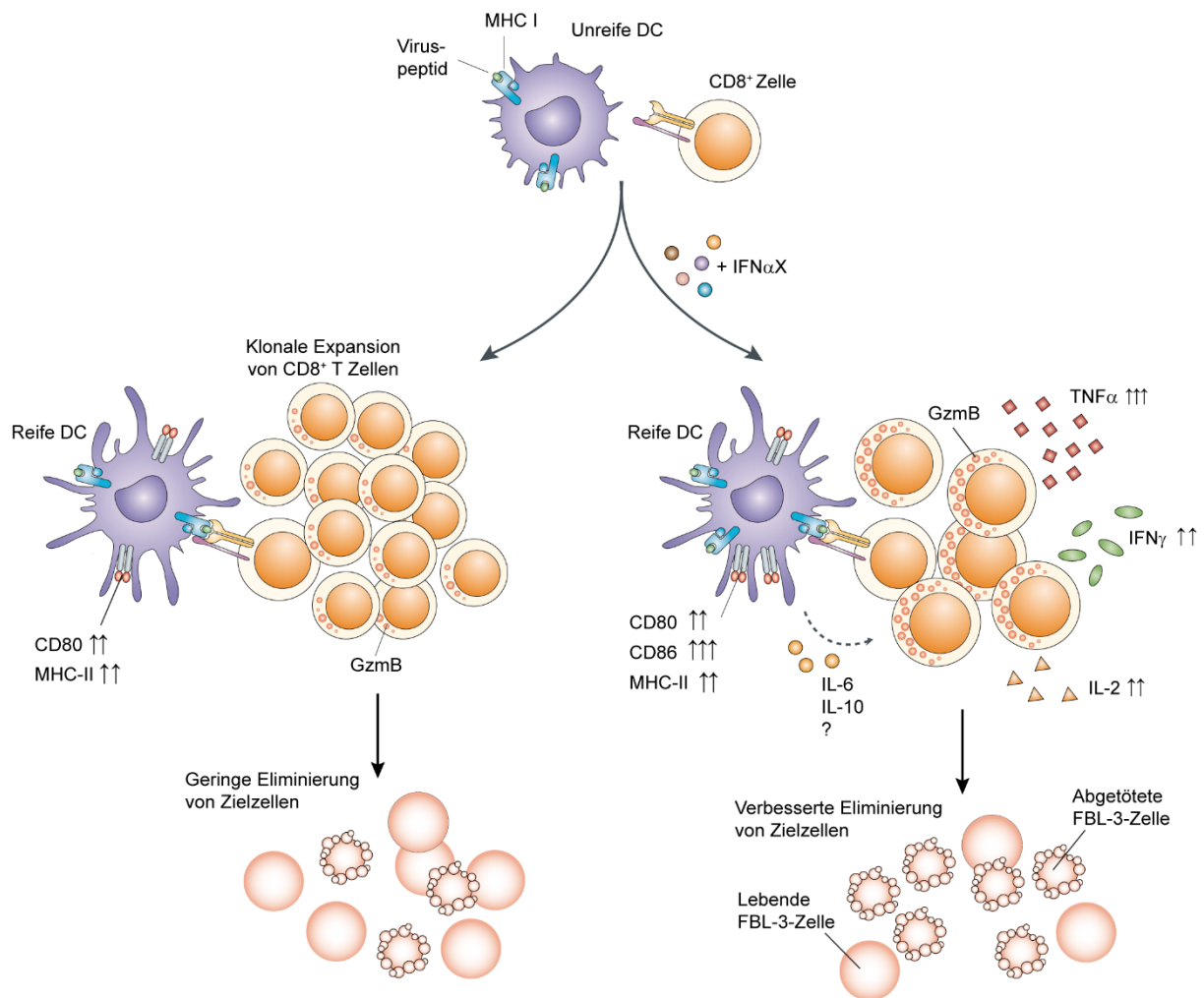


Abb. 4-18 Schematische Darstellung der immunmodulatorischen Eigenschaften von IFNα auf CD8⁺ T Zellen und DCs.

Veröffentlichung mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature (Nature Reviews Immunology „Helping the CD8⁺ T cell response“ von Michael J. Bevan (2004) und „Skin Immune sentinels in health and disease“ von Frank O. Nestle et al. (2009)).

4.2 Untersuchung der Typ I IFN-induzierten Signalwege

4.2.1 Aktivierung verschiedener Typ I IFN Signalwege durch die Stimulation mit IFN α Subtypen *in vitro*

Der genaue Mechanismus, warum die verschiedenen IFN α Subtypen so unterschiedliche biologische Aktivitäten aufweisen, ist bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt. Ein möglicher Effekt kann die Aktivierung diverser Signalkaskaden sein, die durch die Bindung an den gemeinsamen Rezeptor IFNAR ausgelöst werden [32, 85, 88]. Es wurde gezeigt, dass neben dem klassischen JAK/STAT-Signalweg, bei dem die Proteine STAT-1 und STAT-2 rekrutiert und phosphoryliert werden, auch die Phosphorylierung anderer STAT Moleküle (STAT-3, STAT-4, STAT-5 und STAT-6) induziert werden kann. Des Weiteren wurde davon berichtet, dass zusätzlich die PI3K- und NF κ B-, sowie MAPK-Signalwege durch IFNAR Stimulation aktiviert werden können [47, 182]. Auch der stimulierte Zelltyp kann Einfluss auf die Auswirkungen der einzelnen Subtypen haben [147]. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, welche Signalwege nach Stimulation mit den verschiedenen IFN α Subtypen aktiviert wurden. Dafür wurden CD8⁺ T Zellen aus FV TCRtg Mäusen isoliert und für 24 oder 48 h mit FV Peptid beladenen DCs co-kultiviert. Die Zellen wurden mit den verschiedenen IFN α Subtypen stimuliert und als Kontrolle dienten Zellen zum Zeitpunkt 0 h, wie auch unstimulierte Zellen. Anschließend wurden Lysate hergestellt und die Phosphorylierung verschiedener STAT Proteine im Western Blot analysiert. β -Actin wurde als Ladekontrolle mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-19 zu sehen.

In unstimulierten Zellen konnte zum untersuchten Zeitpunkt 0 h weder die Phosphorylierung von STAT-1, noch von STAT-2 nachgewiesen werden, was darauf zurückschließen ließ, dass der klassische JAK/STAT-Signalweg nicht aktiviert war. Des Weiteren konnte weder eine Phosphorylierung von STAT-4 und STAT-5 detektiert werden, eine leichte Bande war nur bei STAT-3 zu sehen. Wie bereits zuvor gezeigt wurde, konnte nach 24 h Co-Inkubation von CD8⁺ T Zellen und DCs ein Effekt durch die IFN α Subtyp Stimulation gemessen werden. Es wurde gezeigt, dass zu diesem Zeitpunkt vor allem die Anteile GzmB-, IFN γ - und TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen durch Stimulation mit IFN α Subtypen erhöht wurden (vgl. Abb. 4-7). In Bezug auf die Phosphorylierung von STAT Proteinen ist ebenfalls

ein Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und den IFN α Subtyp-stimulierten Zellen nach 24 h Co-Kultivierung sichtbar: Während in den unstimulierten Zellen nach wie vor keine Phosphorylierung von STAT-1 detektierbar war, konnte durch die Stimulation mit allen IFN α Subtypen - abgesehen von IFN α 1 und IFN α 2 - die Phosphorylierung von STAT-1 induziert werden.

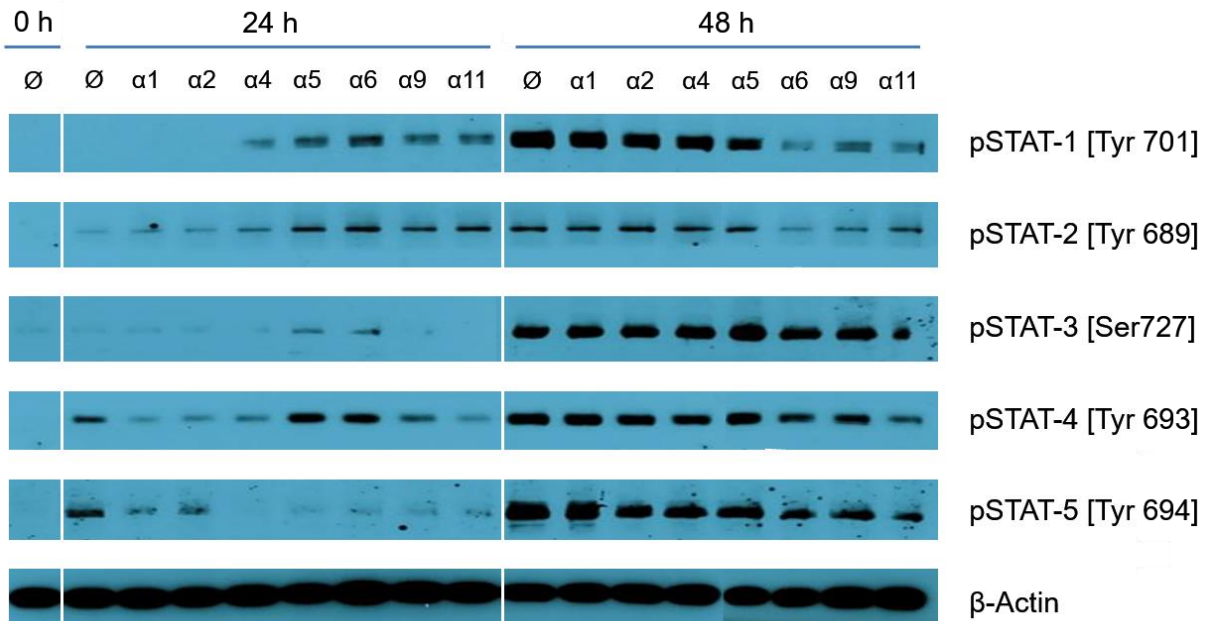


Abb. 4-19 Einfluss der IFN α Subtyp-Stimulation auf die STAT Phosphorylierung im Proliferationstest.

CD8⁺ T Zellen wurden aus FV TCRtg Mäusen isoliert und mit Knochenmark-generierten DCs, die mit dem FV Peptid beladen wurden, für 24 oder 48 h co-kultiviert (\pm 1000 Units IFN α Subtyp/Well). Als Kontrolle dienten Zellen zum Zeitpunkt 0 h und unstimulierte Zellen. Die Zelllysate wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine (phosphorylierte (p) STAT-1, -2, -3, -4 und -5 Proteine) analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Actin. Ein repräsentativer Western Blot ist dargestellt (n=2).

Ein ähnliches Bild zeigte sich in Bezug auf STAT-2. Eine Phosphorylierung wurde in allen Proben detektiert, allerdings kam es nach Stimulation mit IFN α 4, IFN α 5, IFN α 6, IFN α 9 und IFN α 11 zu einer verstärkten Phosphorylierung. Durch die Stimulation mit IFN α 1 und IFN α 2 dagegen konnte keine stärkere Phosphorylierung herbeigeführt werden und war vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle. Die Phosphorylierung von STAT-3 wurde vor allem durch IFN α 5 und IFN α 6 induziert. Im Gegensatz dazu konnte eine starke Phosphorylierung von STAT-4 bereits in der unbehandelten Kontrolle detektiert werden. Nur die Stimulation mit den Subtypen IFN α 5 und IFN α 6 verstärkten die Phosphorylierung von STAT-4 noch weiter. Durch die Stimulation mit allen anderen Subtypen konnte eine vergleichsweise schwache STAT-4

Phosphorylierung beobachtet werden und war geringer als in der unbehandelten Kontrolle. Bezogen auf STAT-5 zeigte sich ein anderes Bild: hier konnte die stärkste Phosphorylierung in der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Nur in IFN α 1- und IFN α 2-stimulierten Zellen war ebenfalls die Phosphorylierung von STAT-5 detektierbar, alle anderen IFN α Subtypen zeigten nur schwache Banden, wodurch folglich nur wenig STAT-5 phosphoryliert wurde.

Zum späteren Zeitpunkt, 48 h nach Co-Kultivierung, gab es kaum Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und den IFN α Subtyp-stimulierten Zellen. Hier konnte eine vergleichsweise starke Phosphorylierung von allen untersuchten STAT Proteinen detektiert werden. Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die hier untersuchten IFN α Subtypen unterschiedliche Effekte auf die Phosphorylierung verschiedener STAT Proteine hatten.

4.2.2 Aktivierung verschiedener Signalwege in CD8⁺ T Zellen oder DCs durch die Stimulation mit IFN α Subtypen

Als nächstes sollte die Phosphorylierung unterschiedlichster Proteine, die an den Typ I IFN-induzierten Signalwegen beteiligt sind, in den einzelnen Zellpopulationen nachgewiesen werden. Dafür wurden CD8⁺ T Zellen und DCs separat für 15 min mit IFN α 9 stimuliert, ein Subtyp, der in den vorherigen *in vitro* Experimenten einen starken Effekt sowohl auf CD8⁺ T Zellen als auch DCs hatte. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt, um die Phosphorylierung der verschiedenen Proteine sowohl im *PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array* zu analysieren, als auch durch Western Blot Analyse.

Der *PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array* ermöglichte die Untersuchung von Proteinen basierend auf den Grundlagen eines Western Blots und eines Sandwich-Immunassays, wobei es hier jedoch nicht, wie bei der Western Blot Methode, zur Denaturierung der Proteine kommt. In unbehandelten CD8⁺ T Zellen und DCs konnte sowohl die Phosphorylierung von STAT-1 (Abb. 4-20 A), STAT-3 (Abb. 4-20 B) als auch STAT-5 (Abb. 4-20 C) gemessen werden. Die 15-minütige Stimulation mit IFN α 9 erhöhte die Phosphorylierung von STAT-1 um das 1,5-fache in CD8⁺ T Zellen und um das 1,4-fache in DCs (Abb. 4-20 A). Die Stimulation mit IFN α 9 zeigte weder in CD8⁺ T Zellen, noch in DCs einen Effekt auf die Phosphorylierung von STAT-3 (Abb. 4-20 B). Die gesteigerte Phosphorylierung von STAT-5 wurde

ausschließlich in CD8⁺ T Zellen detektiert (1,2-fach), in den DCs blieb das Level an phosphoryliertem STAT-5 gleich (Abb. 4-20 C).

Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe der Western Blot Analyse bestätigt. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild: die Stimulation mit IFN α 9 konnte bereits nach 15 min die Phosphorylierung von STAT-1 sowohl in CD8⁺ T Zellen als auch in DCs erhöhen (Abb. 4-20 D), wobei tendenziell eine stärkere Phosphorylierung in den DCs stattgefunden hatte. Gleiche Ergebnisse konnten bezüglich der Phosphorylierung von STAT-2 erzielt werden. Während in unstimulierten CD8⁺ T Zellen keine Phosphorylierung von STAT-3 detektierbar war, waren die Level an phosphoryliertem STAT-3 in unstimulierten DCs bereits sehr hoch. Die Stimulation mit IFN α 9 hatte jedoch keinen weiteren Effekt auf die Phosphorylierung des Tyrosin- oder Serinrestes von STAT-3, weder in CD8⁺ T Zellen noch in DCs. Eine Verstärkung der Phosphorylierung von STAT-4 und STAT-5 durch IFN α 9 Stimulation wurde ausschließlich in den CD8⁺ T Zellen detektiert. DCs zeigten dagegen gar keine Phosphorylierung von STAT-4, das Level an phosphoryliertem STAT-5 war bereits in unstimulierten DCs sehr hoch und die IFN α 9 Stimulation führte zu keiner weiteren Steigerung.

Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass durch IFN α 9 Stimulation sowohl in CD8⁺ T Zellen als auch in DCs STAT-1 und STAT-2 phosphoryliert wurde, was darauf hindeutete, dass der klassische Signalweg in beiden Zelltypen aktiviert wurde. Die Proteine STAT-4 und STAT-5 hingegen wurden nur in CD8⁺ T Zellen verstärkt phosphoryliert, was einen Hinweis darauf gibt, dass in CD8⁺ T Zellen zusätzlich der alternative JAK/STAT-Signalweg aktiviert wurde. STAT-3 und STAT-5 lagen in DCs bereits phosphoryliert vor, die Stimulation mit IFN α 9 hatte aber keinen steigernden Effekt.

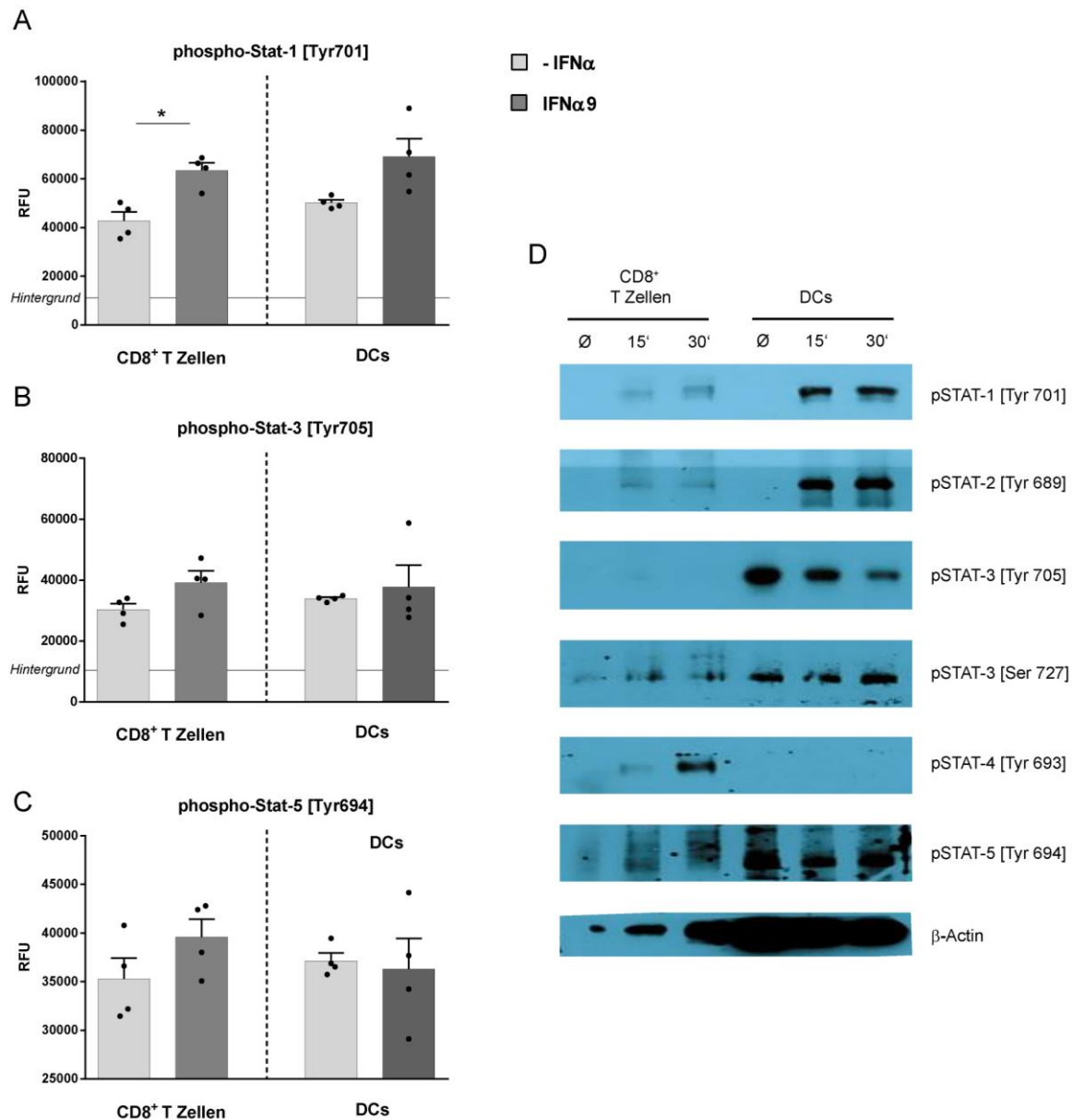


Abb. 4-20 Analyse des JAK/STAT-Signalweges durch IFN α Subtyp-Stimulation in CD8⁺ T Zellen und DCs.

CD8⁺ T Zellen aus FV TCRtg Mäusen, sowie aus dem Knochenmark generierte DCs wurden jeweils mit 1000 Units IFN α 9 für 15 min stimuliert. Der *PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array* wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinexpression wurde anhand eines Intensitätsvergleichs der Dichte der Signalpunkte auf den Röntgenfilmen densitometrisch mit Hilfe der Image Studio™ Lite Software analysiert. Die Ergebnisse für die Phosphorylierung von (A) STAT-1, (B) STAT-3 und (C) STAT-5 sind gezeigt. (D) Für die Analyse von phospho-STAT-1, -2, -3 -4 und -5 wurden CD8⁺ T Zellen und DCs jeweils für 15 oder 30 min stimuliert und im Western Blot mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine analysiert. Als Ladekontrolle diente β-Actin. Ein repräsentativer Western Blot ist dargestellt (n=2).

Des Weiteren sollte auch die Beteiligung und Aktivierung von alternativen Signalwegen untersucht werden. Durch den *PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array* konnte gezeigt werden, dass in unbehandelten CD8⁺ T Zellen und DCs sowohl die Phosphorylierung von p44/p42 MAPK (Erk1/2) als auch von p38

MAPK gemessen werden konnte (Abb. 4-21 A+B). Die Stimulation mit IFN α 9 führte ausschließlich in DCs zu einer stärkeren Phosphorylierung, sowohl von p44/p42 MAPK (Erk1/2) (1,3-fach) als auch von p38 MAPK (1,2-fach). Gleiche Resultate hatte die Western Blot Analyse gezeigt (Abb. 4-21 C). Obwohl auch hier eine verstärkte Phosphorylierung von p44/p42 MAPK (Erk1/2) in CD8⁺ T Zellen durch IFN α 9 Stimulation detektiert werden konnte, war die Zunahme an phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2) in DCs deutlich ausgeprägter. Die erhöhte Phosphorylierung von p38 MAPK durch die Stimulation mit IFN α 9 konnte erneut nur in DCs beobachtet werden. Daraus ließ sich schließen, dass durch die Stimulation mit IFN α 9 der MAPK Signalweg vor allem in DCs induziert wurde.

Bei Betrachtung des PI3K- und NF κ B-Signalweges und der Phosphorylierung daran beteiligter Proteine (AKT und I κ B α) konnte zwar die Phosphorylierung dieser Proteine beobachtet werden, allerdings keine Verstärkung durch die Stimulation mit IFN α 9 (Daten nicht gezeigt).

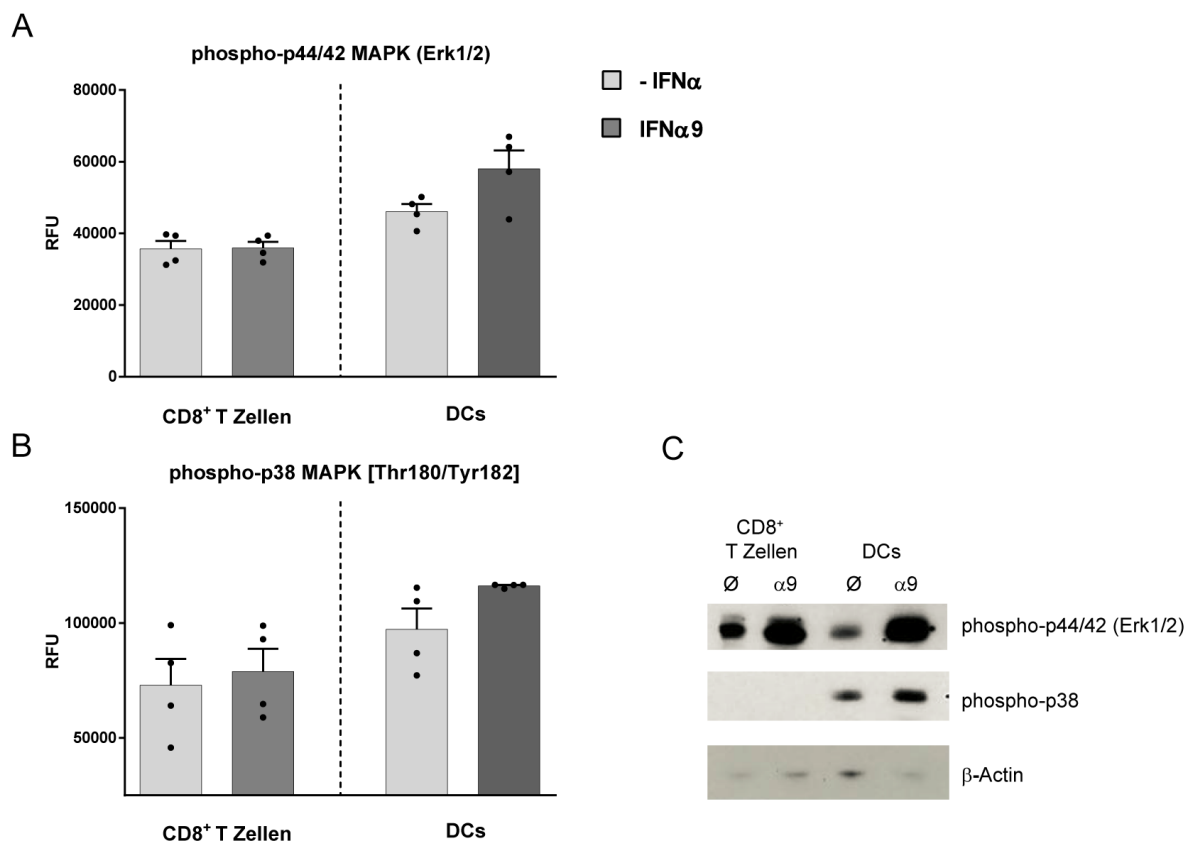


Abb. 4-21 Analyse von alternativen Typ I IFN-induzierten Signalwegen durch IFN α Subtyp-Stimulation in CD8⁺ T Zellen und DCs

CD8⁺ T Zellen aus FV TCRtg Mäusen, sowie aus dem Knochenmark generierte DCs wurden jeweils mit 1000 Units IFN α 9 für 15 min stimuliert. Der *PathScan® Immune Cell Signaling Antibody Array* wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinexpression wurde anhand eines

Intensitätsvergleichs der Dichte der Signalpunkte auf den Röntgenfilmen densitometrisch mit Hilfe der Image Studio™ Lite Software analysiert. Die Ergebnisse für die Phosphorylierung von (A) p44/42 (Erk1/2) und (B) p38 sind gezeigt. (C) Für die Analyse von phospho-p44/42 (Erk1/2) und phospho-p38 wurden Zelllysate im Western Blot mit Antikörpern gegen die entsprechenden Proteine analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Actin. Ein repräsentativer Western Blot ist dargestellt (n=2).

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass durch die Stimulation mit verschiedenen IFN α Subtypen verschiedene STAT Proteine phosphoryliert und somit die klassische als auch alternative Routen des JAK/STAT-Signalweges aktiviert werden können. Bei Betrachtung der Typ I IFN-induzierten Signalwege in CD8⁺ T Zellen und DCs konnte gezeigt werden, dass der klassische Signalweg mit Beteiligung von STAT-1 und STAT-2 in beiden Zelltypen aktiviert wurde, wohingegen der alternative Signalweg (mit Aktivierung von STAT-3, -4, -5, -6) ausschließlich in CD8⁺ T Zellen zu beobachten war. Im Gegensatz dazu konnte nach Untersuchung des MAPK Signalweges gezeigt werden, dass dieser v.a. durch Stimulation mit IFN α 9 in DCs aktiviert wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von Typ I IFN-induzierten Signalwegen sowohl abhängig jeweiligen IFN α Subtyps als auch vom stimulierten Zelltyp ist.

4.3 Immunmodulatorische Effekte von IFN α Subtypen auf CD8⁺ T Zellen während der FV Infektion *in vivo*

4.3.1 Effekt der IFN α Subtyp Behandlung während der akuten FV Infektion

4.3.1.1 Die Behandlung mit IFN α 1, IFN α 4 und IFN α 11 reduziert die Viruslast während der akuten FV Infektion, hat jedoch keinen Effekt auf die Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass während der akuten FV Infektion kein IFN α Protein im Plasma von Mäusen detektierbar ist [62]. Allerdings konnte in Milzzellen eine geringe mRNA Expression von den IFN α Subtypen *IFNA4* und *IFNA9*, nicht aber den Subtypen *IFNA1* oder *IFNA6* detektiert werden [61]. Da die endogene Induktion von IFN α während der akuten FV Infektion sehr gering ist, kann in diesem Modell die therapeutische Behandlung mit IFN α Subtypen in retroviralen Infektionen untersucht werden. Frühere Daten aus *in vitro* und *in vivo* Experimenten zeigten

bereits, dass es deutliche Unterschiede in deren antiretroviralen Effekten gibt [61, 65]. Eine Behandlung mit IFN α 1 während der akuten FV Infektion resultierte in einer erhöhten Anzahl an FV-spezifischen CD8⁺ T Zellen, was mit einer verminderten Viruslast einherging [61]. FV-infizierte Mäuse, die mit dem synthetischen TLR3 Liganden Poly (I:C) behandelt wurden, induzierten eine gesteigerte Typ I IFN Antwort, was schließlich zu verbesserten CD8⁺ T Zellantworten führte und gleichzeitig zu einer Abnahme der Viruslast [63]. Nach wie vor ist jedoch nicht viel über die immunmodulatorischen Effekte von IFN α Subtypen bekannt, und inwiefern sie eine effektive Antigen-spezifische adaptive Immunantwort regulieren können. Daher sollten die IFN α Subtypen therapeutisch bei FV-infizierten Mäusen eingesetzt und die Wirksamkeit auf die CD8⁺ T Zellantworten charakterisiert werden. Dazu wurden C57BL/6 Mäusen während der akuten FV Infektion täglich 8000 Units des jeweiligen IFN α Subtyps i.p. injiziert, beginnend am ersten Tag nach der Infektion. Dafür wurden 5 IFN α Subtypen ausgewählt: IFN α 4, als potentester IFN α Subtyp aus den vorherigen *in vitro* Versuchen, IFN α 2 und IFN α 5, die nur geringe oder mittlere Aktivität aufwiesen und IFN α 1 und IFN α 11, von denen aus früheren *in vivo* Versuchen bekannt ist, dass sie eine starke antivirale Aktivität besitzen [61, 65]. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere. Da 10 Tage nach der Infektion die CD8⁺ T Zellpopulation am stärksten expandiert und aktiviert ist und gleichzeitig die Effektorfunktionen am meisten ausgeprägt ist (GzmB) [241], wurden sowohl die Viruslast als auch die CD8⁺ T Zellantworten an Tag 10 nach der Infektion untersucht. Der schematische Versuchsablauf ist in Abb. 4-22 A zu sehen.

Durch die Behandlung mit den Subtypen IFN α 1, IFN α 4 und IFN α 11 konnte die Viruslast in den Mäusen signifikant, sowohl in der Milz als auch im Knochenmark, reduziert werden (Abb. 4-22 B+C). Dabei hatte IFN α 11 den stärksten antiviralen Effekt und verringerte die Viruslast in der Milz um das 280-fache und im Knochenmark um das 700-fache. Ähnliche Ergebnisse konnte mit der Behandlung mit den Subtypen IFN α 1 (220-fache Reduktion in Milz, 160-fache Reduktion in Knochenmark) und IFN α 4 (93-fache Reduktion in Milz, 510-fache Reduktion in Knochenmark) erzielt werden. In der Milz konnte zwar durch die Behandlung mit IFN α 2 eine Abnahme der Viruslast um den Faktor 25 (14-fache Reduktion im Knochenmark) und durch die Behandlung mit IFN α 5 um den Faktor 3 gemessen werden (10-fache im Knochenmark), was jedoch nicht signifikant war.

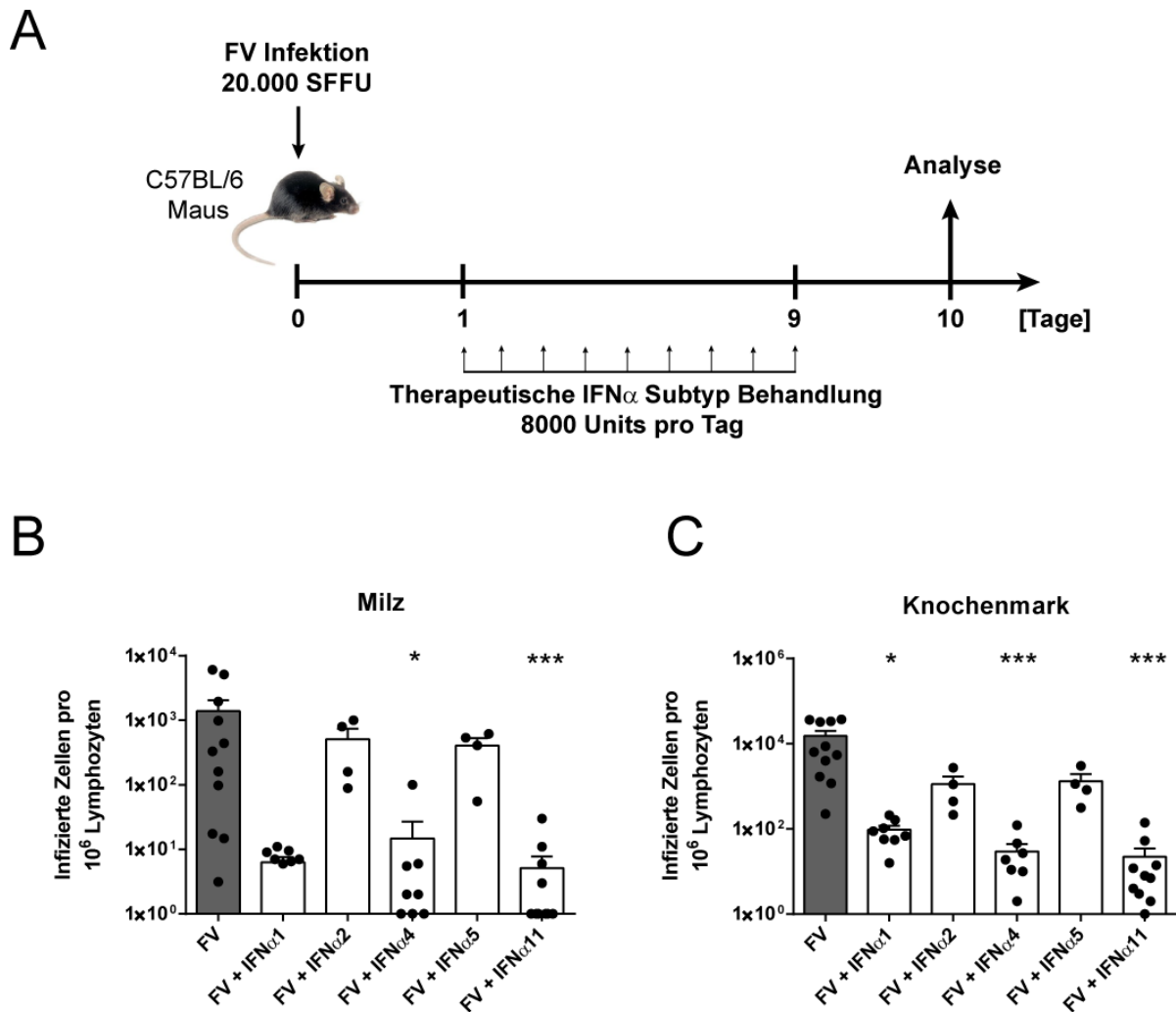


Abb. 4-22 Einfluss der IFN α Subtyp Behandlung auf die Viruslast während der akuten FV Infektion.

C57BL/6 Mäuse wurden ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion mit 20.000 SFFU FV mit den Subtypen IFN α 1, IFN α 2, IFN α 4, IFN α 5 und IFN α 11 i.p. behandelt. Der Versuchsablauf ist schematisch in (A) dargestellt. 10 Tage nach Infektion wurde die Anzahl der infizierten Zellen mittels *Infectious center assays* (B) in der Milz und (C) im Knochenmark bestimmt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion auf ihre Viruslast untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind als Balken dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,001$ angezeigt.

Als nächstes sollten die CD8⁺ T Zellen während der akuten FV Infektion und nach Behandlung mit den verschiedenen IFN α Subtypen durchflusszytometrisch charakterisiert werden. Da im Knochenmark die höchste Viruslast in unbehandelten Mäusen gemessen wurde, und die Reduktion der Virusreplikation durch die verschiedenen IFN α Subtypen dort am stärksten war, wurden die weiteren Analysen nur im Knochenmark durchgeführt. Zunächst konnte an Tag 10 nach Infektion im Vergleich zu naiven Tieren bei unbehandelten FV-infizierten Mäusen eine 4-fach

erhöhte Anzahl an $CD8^+$ T Zellen detektiert werden (durchschnittlich 60.000 $CD8^+$ T Zellen in den infizierten und 15.000 $CD8^+$ T Zellen pro 10^6 Lymphozyten in den naiven Tieren). Die Anzahl an $CD8^+$ T Zellen in den verschiedenen $IFN\alpha$ Subtyp-behandelten Tieren lag durchschnittlich zwischen 20.000 und 40.000 $CD8^+$ T Zellen pro 10^6 Lymphozyten und expandierte somit geringer als die $CD8^+$ T Zellen in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4-23 A).

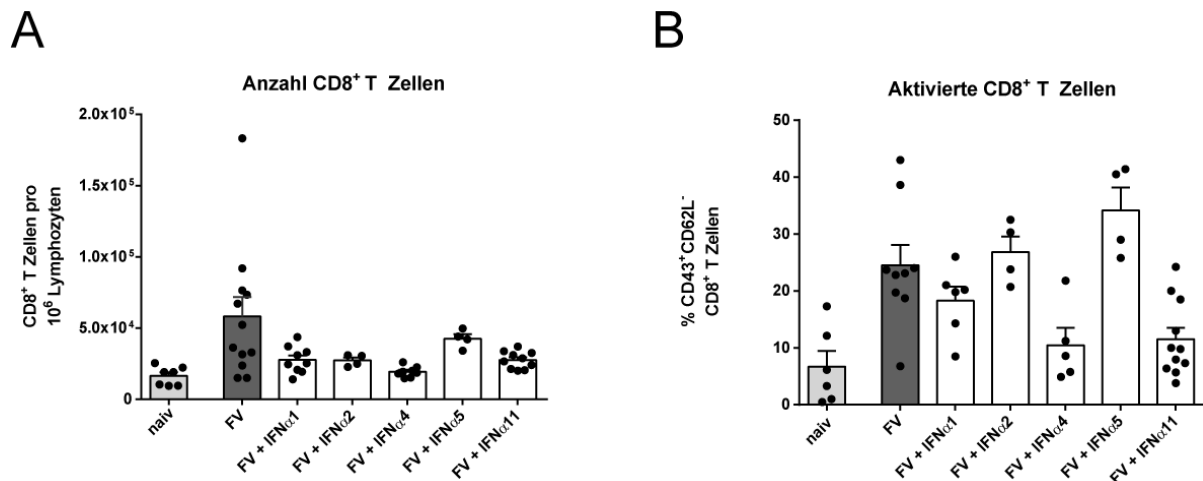


Abb. 4-23 Untersuchung der $CD8^+$ T Zellzahl während der akuten FV Infektion nach $IFN\alpha$ Subtyp Behandlung.

C57BL/6 Mäuse wurden ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion mit 20.000 SFFU FV mit den Subtypen $IFN\alpha 1$, $IFN\alpha 2$, $IFN\alpha 4$, $IFN\alpha 5$ und $IFN\alpha 11$ i.p. behandelt. 10 Tage nach Infektion wurden lebendige Knochenmarkszellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Die Anzahl an $CD8^+$ T Zellen, (B) die Anzahl an Tetramer I (Tet I)-positiver FV-spezifischer $CD8^+$ T Zellen sowie (C) der Anteil aktivierter $CD8^+$ T Zellen gemessen an der Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker $CD43$ und $CD62L$ sind dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind als Balken dargestellt.

Um die $CD8^+$ T Zellantwort nach $IFN\alpha$ Subtyp Behandlung genauer zu charakterisieren, wurde zusätzlich die Aktivierung von $CD8^+$ T Zellen ($CD43^+CD62L^-$) durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 4-23 B). Während die FV Infektion eine Expansion an aktivierten $CD8^+$ T Zellen induzierte (24 % $CD43^+ CD62L^- CD8^+$ T Zellen), hatte die $IFN\alpha$ Subtyp Behandlung hierauf keinen signifikanten Einfluss. Tendenziell reduzierte sich der Anteil aktivierter $CD8^+$ T Zellen in $IFN\alpha 1$ - (18 %), $IFN\alpha 4$ - (10 %) und $IFN\alpha 11$ - (11,5 %) behandelten Mäusen sogar, während in $IFN\alpha 2$ - (27 %) und $IFN\alpha 5$ - (34 %) behandelten Tieren der Anteil aktivierter $CD8^+$ T Zellen etwas höher lag als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Alle Veränderungen waren aber nicht signifikant.

Als nächstes sollte die Anzahl FV-spezifischer CD8⁺ T Zellen mit Hilfe von MHC I Tetrameren untersucht werden. Diese Tetramere präsentieren das FV GagL Peptid, wodurch sie nur von FV-spezifischen CD8⁺ T Zellen gebunden werden können. In unbehandelten Mäusen konnten etwa 6800 FV-spezifische CD8⁺ T Zellen pro 10⁶ Lymphozyten detektiert werden (Abb. 4-23 C). In IFN α Subtyp-behandelten Tieren wurden zwischen 1500 und 4000 FV-spezifische CD8⁺ T Zellen pro 10⁶ Lymphozyten induziert, womit die Anzahl sogar geringer war als in der unbehandelten Gruppe.

Schließlich sollte der Einfluss der IFN α Subtyp Behandlung auf die Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen untersucht werden. Hierfür wurden die Anteile GzmB-, IFN γ - IL-2- und TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen in IFN α Subtyp-behandelten Tieren durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurden die Subtypen IFN α 1, IFN α 4 und IFN α 11 ausgewählt, da hier zuvor eine Reduktion der Viruslast messbar war (Abb. 4-22 B+C). Wie in Abb. 4-24 A zu sehen ist, war während der FV Infektion der Anteil GzmB-produzierender CD8⁺ T Zellen erhöht. Durch die Behandlung mit den drei antiviral wirkenden IFN α Subtypen konnte der Anteil GzmB-produzierender CD8⁺ T Zellen nicht gesteigert werden. Auch die intrazellulär exprimierte Menge an GzmB (MFI) war zwischen allen Gruppen, mit der Ausnahme von IFN α 4, vergleichbar (Abb. 4-24 B). Hier war eine leicht erhöhte Expression messbar.

Ähnliche Ergebnisse konnten für IFN γ - (Abb. 4-24 C), IL-2- (Abb. 4-24 D) oder TNF α - (Abb. 4-24 E) produzierende CD8⁺ T Zellen gemessen werden. Zwar war durch die FV Infektion der Anteil Zytokin-produzierender CD8⁺ T Zellen erhöht, allerdings hatte auch hier die IFN α Subtyp Behandlung keinen Effekt darauf, weder auf die prozentualen Anteile noch auf die exprimierte Menge, gemessen als MFI (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass die Behandlung mit IFN α 1, IFN α 4 und IFN α 11 während der akuten FV Infektion zwar die Viruslast senken konnte, jedoch keine messbaren immunmodulatorischen Effekte auf CD8⁺ T Zellen hatte.

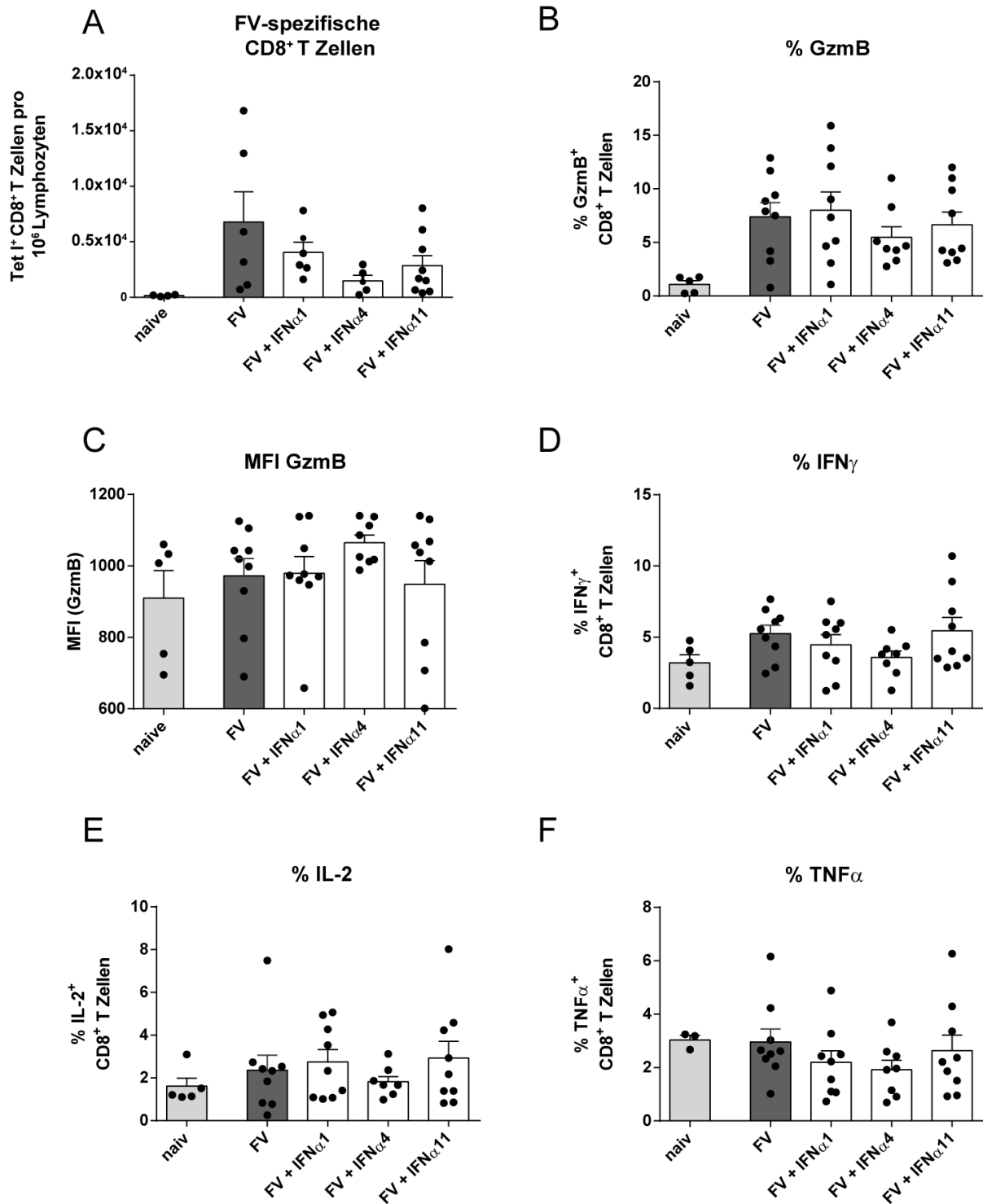


Abb. 4-24 Analyse der Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen während der akuten FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.

C57BL/6 Mäuse wurden ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion mit 20.000 SFFU FV mit den Subtypen IFN α 1, IFN α 4 und IFN α 11 i.p. behandelt. 10 Tage nach Infektion wurden lebendige Knochenmarkszellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Der Anteil FV-spezifischer Tet⁺ CD8⁺ T Zellen, der Anteil (B) GzmB-produzierender CD8⁺ T Zellen, (C) die MFI von GzmB, sowie die Anteile (D) IFN γ -, (E) IL-2- und (F) TNF α -produzierender CD8⁺ T Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert und die Mittelwerte (+SEM) als Balken dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion untersucht.

4.3.1.2 In IFN α 1-, IFN α 4- und IFN α 11-behandelten Mäusen ist die Anzahl an regulatorischen CD4⁺ T Zellen verringert

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass CD8⁺ T Zellen während der akuten FV Infektion große Mengen an GzmB produzieren und damit maßgeblich dazu beitragen die akute Infektion zu kontrollieren. Die Depletion von CD8⁺ T Zellen während dieser Phase der akuten Infektion induziert einen signifikanten Anstieg der Viruslast [79, 186]. In der chronischen FV Infektion sind CD8⁺ T Zellen jedoch dysfunktional [242, 243]. Es konnte gezeigt werden, dass regulatorische CD4⁺ T Zellen in der späten Phase der akuten Infektion expandieren, die CD8⁺ T Zellantwort inhibieren und somit eine vollständige Viruseliminierung verhindern [45]. Daher sollte als nächstes in der akuten Infektion untersucht werden, ob die Behandlung mit den verschiedenen IFN α Subtypen einen Effekt auf regulatorische CD4⁺ T Zellen hatte. C57BL/6 Mäuse wurden, wie in 4.3.1.1 beschrieben, mit dem FV infiziert und mit verschiedenen IFN α Subtypen behandelt. CD4⁺ T Zellen und regulatorische CD4⁺ T Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

In unbehandelten Mäusen wurde eine starke Expansion der CD4⁺ T Zellen nach FV Infektion gemessen (FV-infiziert: 35.000 CD4⁺ T Zellen; naiv: 13.000 CD4⁺ T Zellen pro 10⁶ Lymphozyten). Die therapeutische Behandlung mit den verschiedenen IFN α Subtypen inhibierte diese Expansion der CD4⁺ T Zellen, so dass teilweise signifikant weniger CD4⁺ T Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen wurden (Abb. 4-25 A). Wie erwartet, war in unbehandelten Mäusen auch eine Expansion der regulatorischen CD4⁺ T Zellen durch die FV Infektion zu beobachten (Abb. 4-25 B). In den IFN α Subtyp-behandelten Tieren lag die Anzahl der regulatorischen CD4⁺ T Zellen deutlich unter den unbehandelten Kontrollen. In den IFN α 4-behandelten Mäusen war diese Anzahl sogar signifikant geringer und blieb fast auf dem gleichen Level wie in den naiven Tieren.

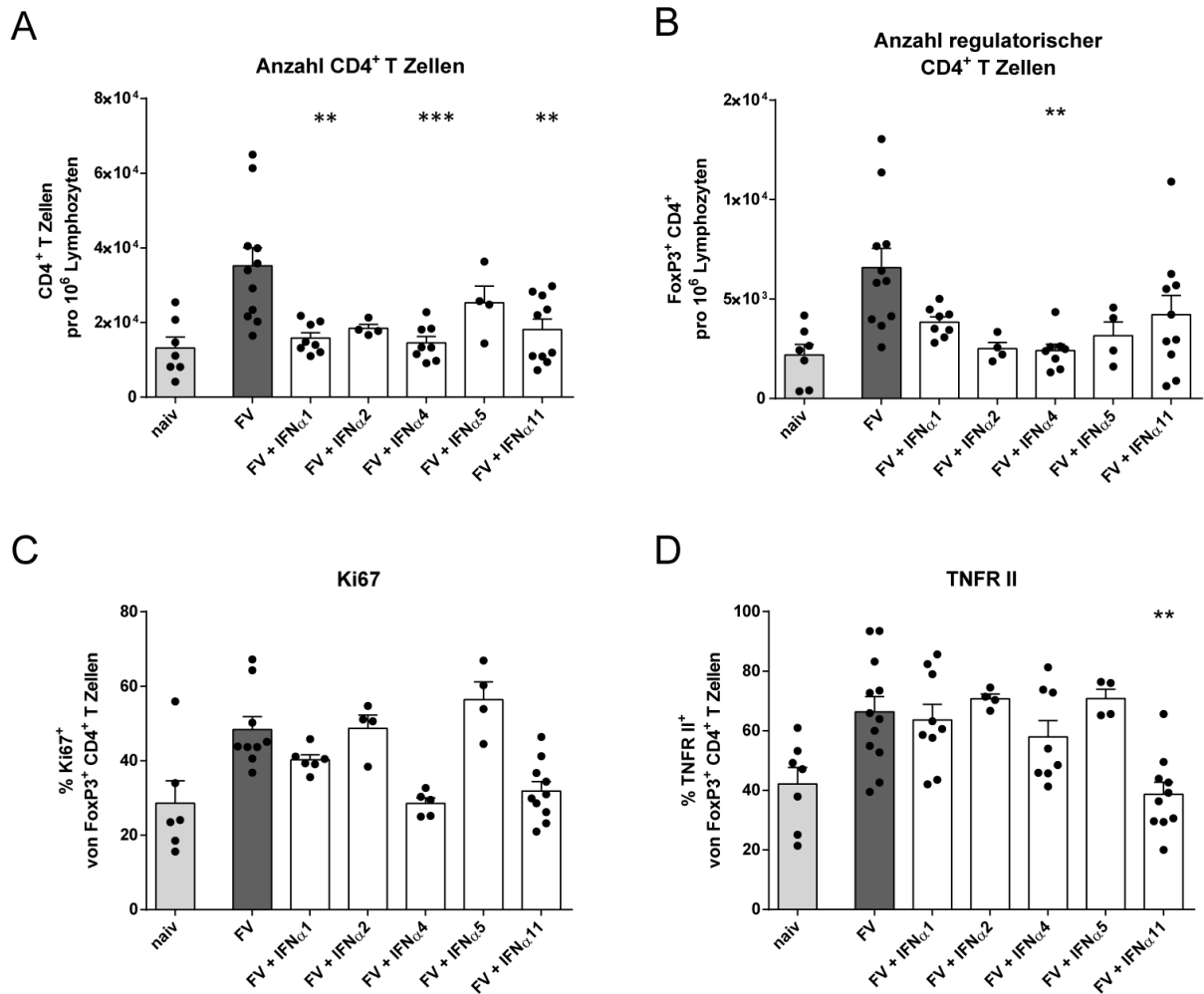


Abb. 4-25 Analyse von regulatorischen CD4⁺ T Zellen während der akuten FV Infektion nach IFNα Subtyp Behandlung.

C57BL/6 Mäuse wurden ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion mit 20.000 SFFU FV mit den Subtypen IFNα1, IFNα2, IFNα4, IFNα5 und IFNα11 i.p. behandelt. 10 Tage nach Infektion wurden lebendige Knochenmarkszellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Die Anzahl an CD4⁺ T Zellen, (B) die Anzahl an regulatorischen FoxP3-positiven CD4⁺ T Zellen, (C) der Anteil proliferierender regulatorischer CD4⁺ T Zellen gemessen am Teilungsmarker Ki67, sowie (D) der Anteil aktivierter regulatorischer CD4⁺ T Zellen gemessen an der Oberflächenexpression des Aktivierungsmarker TNFR II sind dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind als Balken dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFNα Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ angezeigt.

Schließlich sollte die Proliferationskapazität und der Aktivierungsstatus der regulatorischen CD4⁺ T Zellen während der akuten Infektion und nach Behandlung mit den verschiedenen IFNα Subtypen untersucht werden. Daher wurde der Anteil Ki67-positiver (Proliferation), sowie der Anteil TNFRII-exprimierender (Aktivierung) regulatorischer CD4⁺ T Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Während der akuten FV Infektion verdoppelte sich der Anteil proliferierender regulatorischer CD4⁺ T Zellen (50 %) im Vergleich zu naiven Mäusen (Abb. 4-25 C). Die Behandlung mit

IFN α 2 und IFN α 5 hatte keinen Effekt auf die Proliferation der regulatorischen CD4⁺ T Zellen und die Anteile waren vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle. Tendenziell proliferierten die regulatorischen CD4⁺ T Zellen in den IFN α 1- (40 %), IFN α 4- (28 %) und IFN α 11- (31 %) behandelten Tieren weniger, was jedoch nicht signifikant war. Ein ähnliches Ergebnis konnte bezüglich der Aktivierung der regulatorischen CD4⁺ T Zellen erzielt werden. Nur die Behandlung mit IFN α 11 führte zu einer signifikanten Reduktion und hier waren die regulatorischen CD4⁺ T Zellen vergleichbar gering aktiviert wie in naiven Tieren.

4.3.1.3 IFN α 11 reduziert die Viruslast in akut FV-infizierten Mäusen und aktiviert Typ I IFN Signalwege in CD8⁺ T Zellen

Da der beobachtete immunmodulatorische Effekt der verschiedenen IFN α Subtypen auf CD8⁺ T-Zellen *in vivo* sehr gering war, sollte als nächstes untersucht werden, ob während der therapeutischen Behandlung mit IFN α Subtypen diese überhaupt direkt auf CD8⁺ T Zellen wirkten. Dazu wurde eine transgene ISRE-eGFP Reportermaus verwendet, welche in allen Zellen eGFP exprimiert, in denen der IFN α Signalweg aktiviert wurde.

Deshalb wurden ISRE-eGFP Mäuse, wie bereits zuvor (siehe Abb. 4-19 A) beschrieben, mit dem FV infiziert und mit IFN α 5, als weniger antiviral wirkender IFN α Subtyp, und IFN α 11, als stark antiviral wirkender IFN α Subtyp, behandelt. An Tag 10 nach der Infektion wurde die Milz entnommen und die eGFP Expression in CD8⁺ T Zellen, gemessen als MFI, untersucht. Eine repräsentative Eingrenzungsstrategie der durchflusszytometrischen Analyse ist in Abb. 4-26 zu sehen.

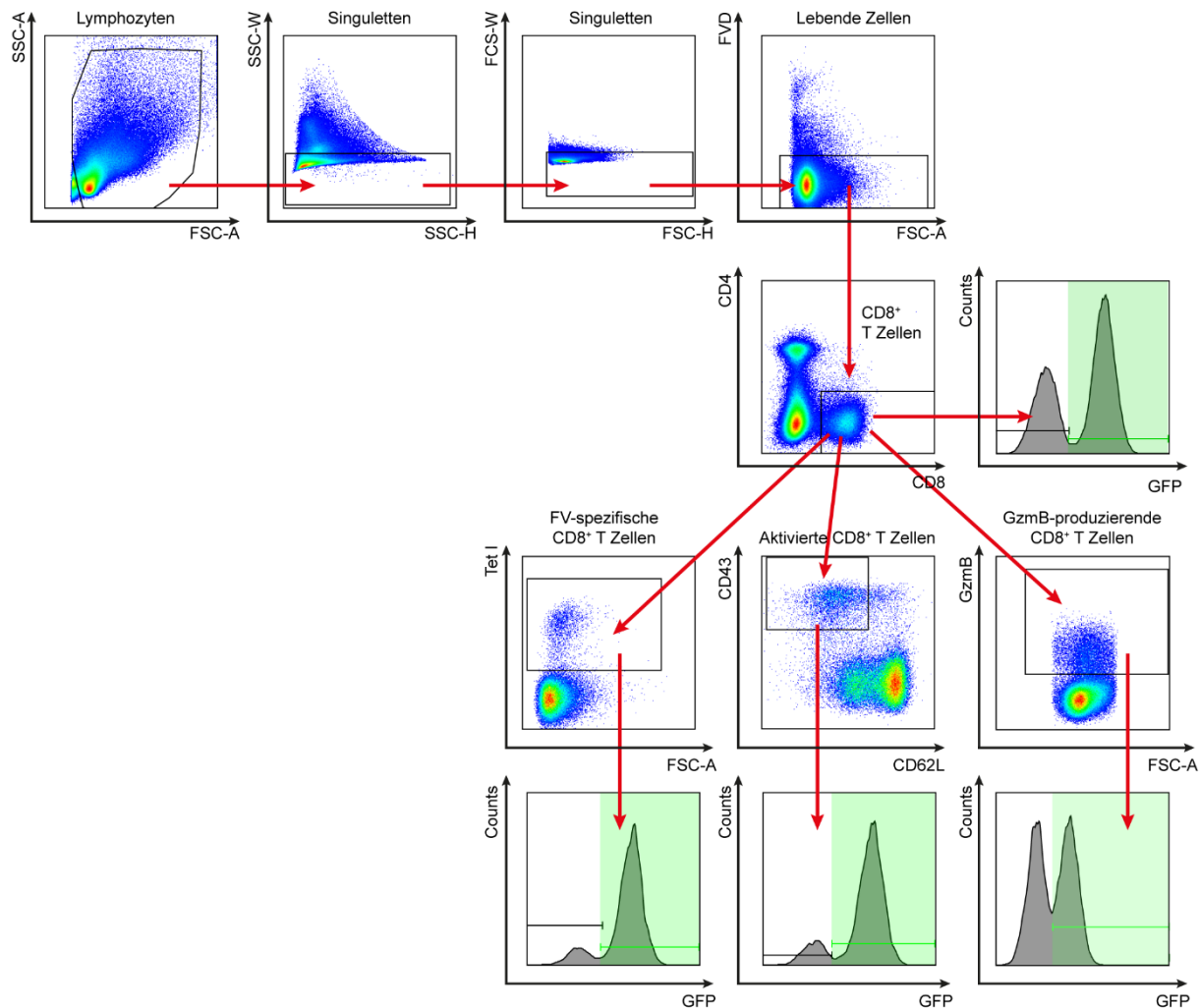


Abb. 4-26 Schematische Darstellung für die durchflusszytometrische Analyse der eGFP Expression in CD8⁺ T Zellen.

CD8⁺ T Zellen wurden zunächst im *Dotplot* im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht entsprechend ihrer Größe eingegrenzt, Dubletten und tote Zellen wurden exkludiert und CD8⁺ T Zellen wurden gemäß der Expression des Oberflächenmarkers CD8 ausgewählt. Anschließend wurden Tetramer-positive FV-spezifische CD8⁺ T Zellen, aktivierte CD8⁺ T Zellen (CD43⁺CD62L⁺) und GzmB-produzierende CD8⁺ T Zellen bezüglich der Expression von eGFP untersucht. Die Analyse wurde mit Hilfe der *FlowJo* Software durchgeführt.

Die therapeutische Behandlung mit IFN α 11 führte zu einer signifikanten Zunahme der eGFP Expression in CD8⁺ T Zellen (Abb. 4-27 A). Weiterhin war eine vermehrte eGFP Expression in Virus-spezifischen CD8⁺ T Zellen (Tet⁺; Abb. 4 25 B), wie auch in GzmB⁺ CD8⁺ T Zellen zu detektieren (Abb. 4 25 C). Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung mit IFN α 5 nur in einer signifikant erhöhten eGFP Expression in aktivierten CD8⁺ T Zellen (Abb. 4 25 A).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die FV Infektion die Expression von eGFP und damit die Aktivierung von Typ I IFN Signalwegen in CD8⁺ T Zellen induziert werden konnte. Die Behandlung mit beiden IFN α Subtypen

induzierte jeweils eine stärkere Expression von eGFP im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, wobei IFN α 11 deutlich stärker auf die CD8 $^{+}$ T Zellen wirkte.

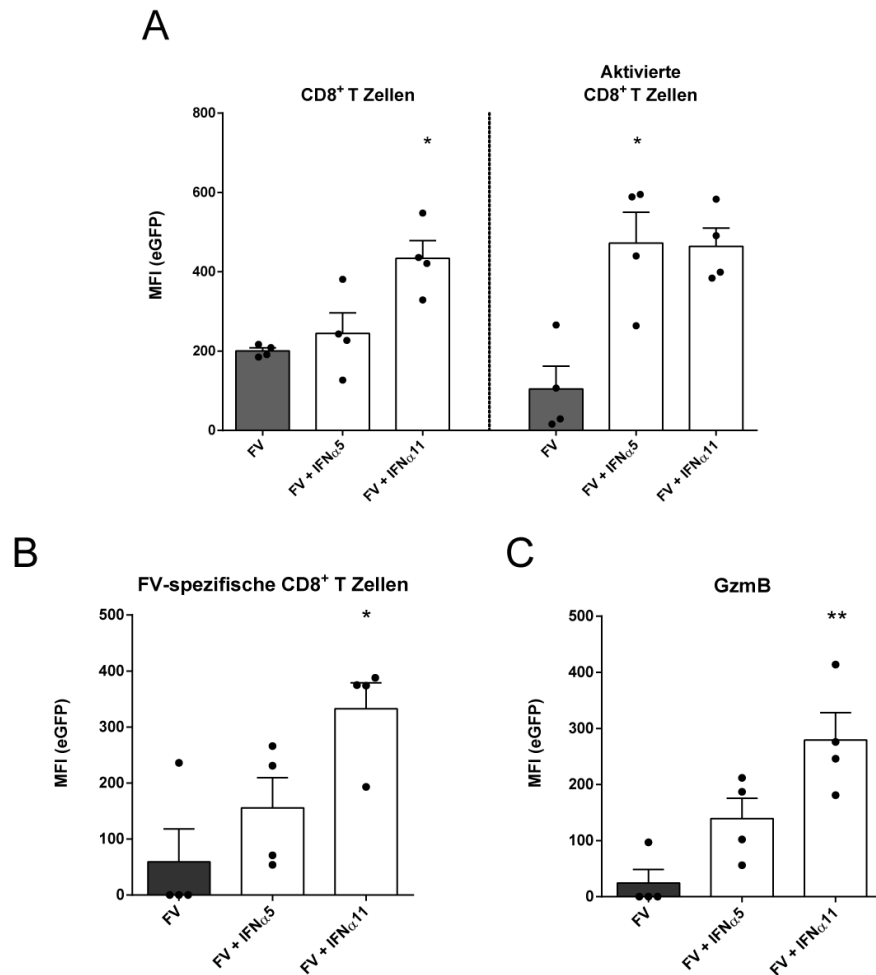


Abb. 4-27 Einfluss der IFN α Subtyp Behandlung auf die Aktivierung von Typ I IFN Signalwegen in CD8 $^{+}$ T Zellen während der akuten FV Infektion.

ISRE-eGFP Mäuse wurden ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion mit 20.000 SFFU FV mit den Subtypen IFN α 5 und IFN α 11 i.p. behandelt. 10 Tage nach Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurde die eGFP Expression in CD8 $^{+}$ T Zellen als MFI von (A) CD8 $^{+}$ T Zellen (gesamte CD8 $^{+}$ T Zellen und aktivierte CD8 $^{+}$ T Zellen), (B) FV-spezifischen CD8 $^{+}$ T Zellen und (C) GzmB-produzierenden CD8 $^{+}$ T Zellen dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der akuten Infektion untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind, abzüglich der MFI von naiven Kontrollmäusen, als Balken dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$ und ** für $p < 0,01$ angezeigt.

4.3.2 Effekt der IFN α Subtyp Behandlung während der chronischen FV Infektion

4.3.2.1 Die frühe Behandlung mit IFN α 1 und IFN α 11 führt zu einer Reduktion der Viruslast chronisch infizierter Mäuse

Ähnlich wie die FV Infektion, ist auch die Infektion mit dem Lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV *Clone 13*) in Mäusen persistierend. In chronisch LCMV-infizierten Mäusen können hohe Level an ISGs gemessen werden. Blockiert man während der chronischen Phase der LCMV Infektion den IFNAR, so sinkt die Viruslast [215, 232]. Später fand man heraus, dass die spezifische Inhibition des IFN β , aber nicht des IFN α Signalwegs, dafür verantwortlich ist [157]. Daher sollte als nächstes untersucht werden, welchen Effekt die IFN α Subtyp Behandlung in chronisch FV-infizierten Mäusen hat. Dazu wurden C57BL/6 Mäuse mit 40.000 SFFU FV und zusätzlichen 100.000 FFU F-MuLV infiziert und entweder in der frühen Phase der Infektion (Tag 1 - 9 nach FV Infektion) oder erst in der späten Phase der Infektion (Tag 41 - 49 nach FV Infektion) mit IFN α 1 und IFN α 11 behandelt. Beide IFN α Subtypen zeigten in der akuten FV Infektion einen starken antiviralen Effekt und konnten die Viruslast signifikant reduzieren. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere. 50 Tage nach der Infektion wurde die Viruslast in der Milz untersucht. Da in der chronischen FV Infektion das Virus vor allem in der Milz nachweisbar ist, wurden alle Effekte dort untersucht. Der schematische Versuchsablauf ist in Abb. 4-28 A dargestellt.

Wie in Abb. 4-28 B zu sehen ist, führte die frühe Behandlung sowohl mit IFN α 1 als auch mit IFN α 11 zu einer signifikanten Reduktion der chronischen Viruslast. Dabei hatte IFN α 11 einen stärkeren Effekt (25-fache Reduktion), als die Behandlung mit IFN α 1 (6-fache Reduktion) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Eine späte Behandlung mit beiden IFN α Subtypen reduzierte zwar die Viruslast jeweils um den Faktor 3, was jedoch nicht signifikant war. Somit führte nur die frühe Behandlung mit den Subtypen IFN α 1 und IFN α 11 zu einer signifikanten Verringerung, jedoch nicht zur vollständigen Eliminierung des Virus in der Milz von chronisch FV-infizierten Mäusen.

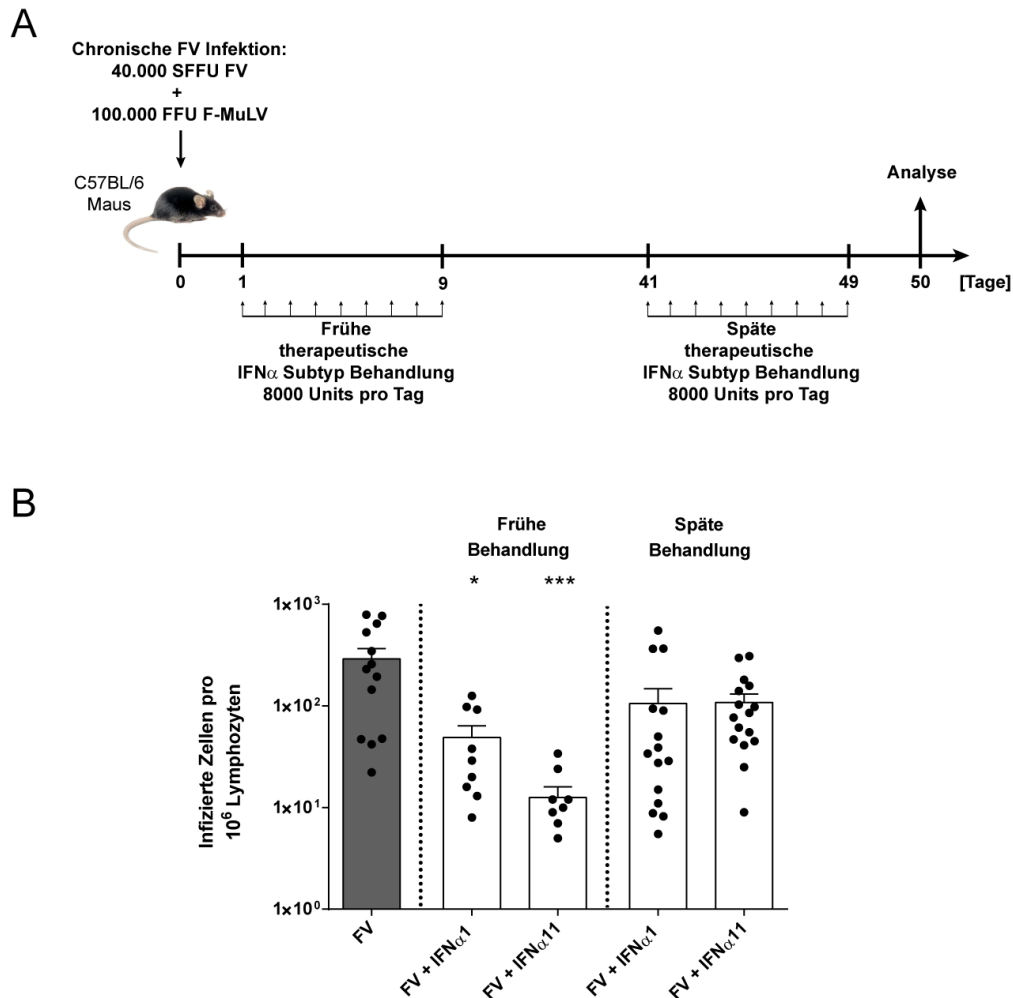


Abb. 4-28 Einfluss der IFN α Subtyp Behandlung auf die Viruslast während der chronischen FV Infektion.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 40.000 SFFU FV + 100.000 FFU F-MuLV infiziert und entweder ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion (frühe Behandlung) oder ab dem 41. bis zum 49. Tag nach FV Infektion (späte Behandlung) mit den Subtypen IFN α 1 und IFN α 11 behandelt. Der Versuchsablauf ist schematisch in (A) dargestellt. 50 Tage nach Infektion wurde die Anzahl der infizierten Zellen mittels *Infectious center assays* in der Milz bestimmt (B). Mindestens 8 Mäuse pro Gruppe wurden in der chronischen Infektion auf ihre Viruslast untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind als Balken dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFN α Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als * für $p < 0,05$ und *** für $p < 0,001$ angezeigt.

4.3.2.2 Immunmodulatorische Effekte der IFN α Subtyp Therapie auf CD8⁺ T Zellen in der chronischen FV Infektion

FV-spezifische CD8⁺ T Zellen verlieren in der chronischen Phase der Infektion ihre Effektorfunktionen (Expression von Perforin, GzmA, GzmB und IFN γ) und werden dysfunktional [45]. Daher sollte die Wirksamkeit der IFN α Subtypen auf CD8⁺ T Zellen, deren Zytotoxizität und die Expression inhibitorischer Rezeptoren (PD-1) untersucht werden.

In unbehandelten, chronisch infizierten Tieren war die Anzahl der CD8⁺ T Zellen vergleichbar mit der in naiven Mäusen. Ähnliche Ergebnisse konnten schon in früheren Arbeiten beobachtet werden, wo gezeigt wurde, dass das Maximum der CD8⁺ T Zellexpansion an Tag 10 - 12 erreicht wurde und anschließend eine Kontraktion zu beobachten war [241]. Allerdings konnte ein erhöhter Anteil aktivierter CD8⁺ T Zellen in infizierten Mäusen im Vergleich zu naiven Tieren beobachtet werden (Abb. 4-29 B). In früh IFN α 1- und IFN α 11-behandelten Mäusen war der Anteil aktivierter CD8⁺ T Zellen vergleichbar mit dem in naiven Mäusen. In spät behandelten Tieren waren die Anteile eher vergleichbar zur unbehandelten Kontrolle. Als nächstes sollten die CD8⁺ T Zellen bezüglich ihres zytotoxischen Potentials untersucht werden. Daher wurde die Expression von Eomes untersucht, ein Transkriptionsfaktor, der die Aktivierung des zytotoxischen Programms in CD8⁺ T reguliert [94, 173], sowie die intrazelluläre Expression von GzmB. Der Anteil Eomes-exprimierender CD8⁺ T Zellen betrug in der chronischen FV Infektion 22 % (naive Mäuse: 14 %) (Abb. 4-29 C). Nur die späte Behandlung mit IFN α 11 konnte den Anteil Eomes-exprimierender CD8⁺ T Zellen signifikant auf 34 % steigern, in allen anderen IFN α Subtyp-behandelten Mäusen war der Anteil vergleichbar mit dem in unbehandelten Tieren. Ein ähnliches Ergebnis konnte bezüglich der Expression von GzmB erzielt werden (Abb. 4-29 D). Während in FV-infizierten Mäusen der Anteil GzmB-exprimierender CD8⁺ T Zellen kaum höher war als in naiven Mäusen (0,4 % in infizierten Tieren im Vergleich zu 0,2 % in naiven Tieren), konnte die späte Behandlung mit IFN α 11 diesen Anteil signifikant auf 1,8 % anheben. Auch die späte Behandlung mit IFN α 1 führte zu einer leichten Steigerung GzmB-exprimierender CD8⁺ T Zellen (0,7 %), was jedoch nicht signifikant war. Die frühe Behandlung mit IFN α 1 oder IFN α 11 hatte dagegen keinen Effekt auf den Anteil GzmB-exprimierender CD8⁺ T Zellen in der chronischen Infektion (jeweils 0,3 %).

Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass nur die späte Behandlung mit IFN α 11 einen immunmodulatorischen Effekt auf die Aktivierung und den zytotoxischen Phänotyp von CD8⁺ T Zellen hatte.

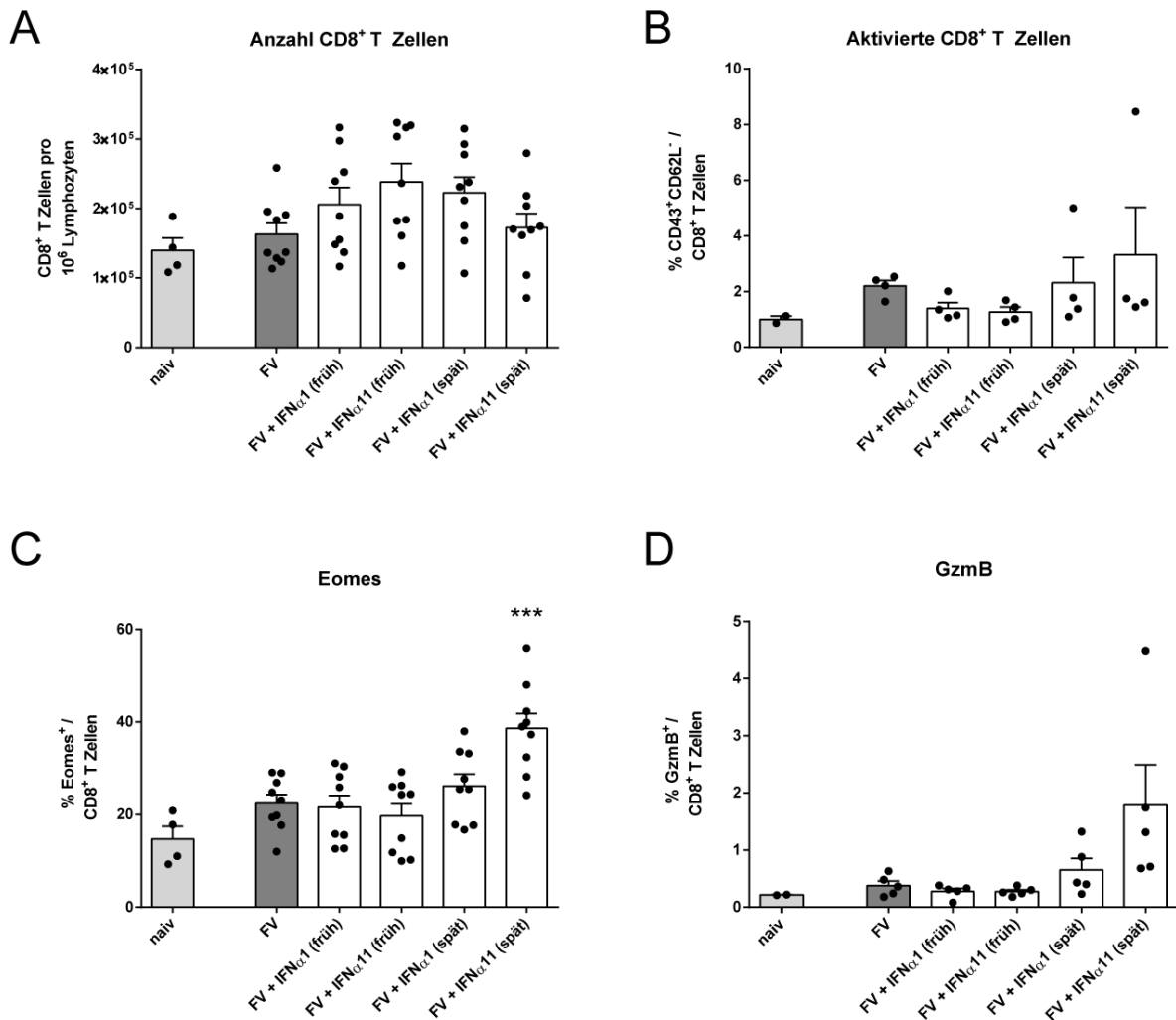


Abb. 4-29 Untersuchung der CD8⁺ T Zellantwort während der chronischen FV Infektion nach IFNα Subtyp Behandlung.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 40.000 SFFU FV + 100.000 FFU F-MuLV infiziert und entweder ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion (frühe Behandlung) oder ab dem 41. bis zum 49. Tag nach FV Infektion (späte Behandlung) mit den Subtypen IFNα1 und IFNα11 behandelt. 50 Tage nach Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Die Anzahl an CD8⁺ T Zellen, (B) der Anteil aktivierter CD8⁺ T Zellen gemessen an der Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD43 und CD62L, (C) der Anteil Eomes-exprimierender CD8⁺ T Zellen, (D) sowie der Anteil GzmB-produzierender CD8⁺ T Zellen sind dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der chronischen Infektion untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind als Balken dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den IFNα Subtyp stimulierten Gruppen und der unbehandelten Gruppe wurden durch einen *Kruskal-Wallis one-way* und dem *Dunn's multiple comparison Test* analysiert und als *** für $p < 0,001$ angezeigt.

Schließlich sollte die Dysfunktionalität der CD8⁺ T Zellen anhand der Expression des inhibitorischen Rezeptors PD-1 untersucht werden. Während der chronischen FV Infektion konnte bereits gezeigt werden, dass CD8⁺ T Zellen funktional eingeschränkt sind und nur wenig Zytokine und GzmB produzieren. Diese Dysfunktion wird einerseits durch die Expression von inhibitorischen Rezeptoren, wie PD-1 und Tim-3, andererseits durch die Expansion von regulatorischen CD4⁺ T Zellen induziert [43,

241]. In diesem Versuch sollte daher während der chronischen Infektion der Effekt der IFN α Subtyp Behandlung auf die Expression von PD-1 auf CD8 $^{+}$ T Zellen durchflusszytometrisch untersucht werden. In unbehandelten Mäusen exprimierten 4,3 % der CD8 $^{+}$ T Zellen PD-1. Durch die Behandlung mit IFN α 11 in der frühen Phase der Infektion war dieser Anteil signifikant geringer (1,6 %) und vergleichbar mit naiven Mäusen (1,3%). Die Behandlung mit IFN α 1 in der frühen Phase (3,4 %), oder IFN α 1 (3,5 %) bzw. IFN α 11 (3,9 %) in der späten Phase hatte kaum einen Effekt auf den Anteil PD-1-exprimierender CD8 $^{+}$ T Zellen (Abb. 4-30 A). Vergleichbare Ergebnisse waren in der Menge an PD-1, gemessen anhand der MFI, zu beobachten (Abb. 4-30 B). Zusammengefasst wurde gezeigt, dass ausschließlich die Behandlung mit IFN α 11 in der frühen Phase der Infektion einen Einfluss auf die PD-1 Expression auf CD8 $^{+}$ T Zellen in der chronischen Infektion hatte.

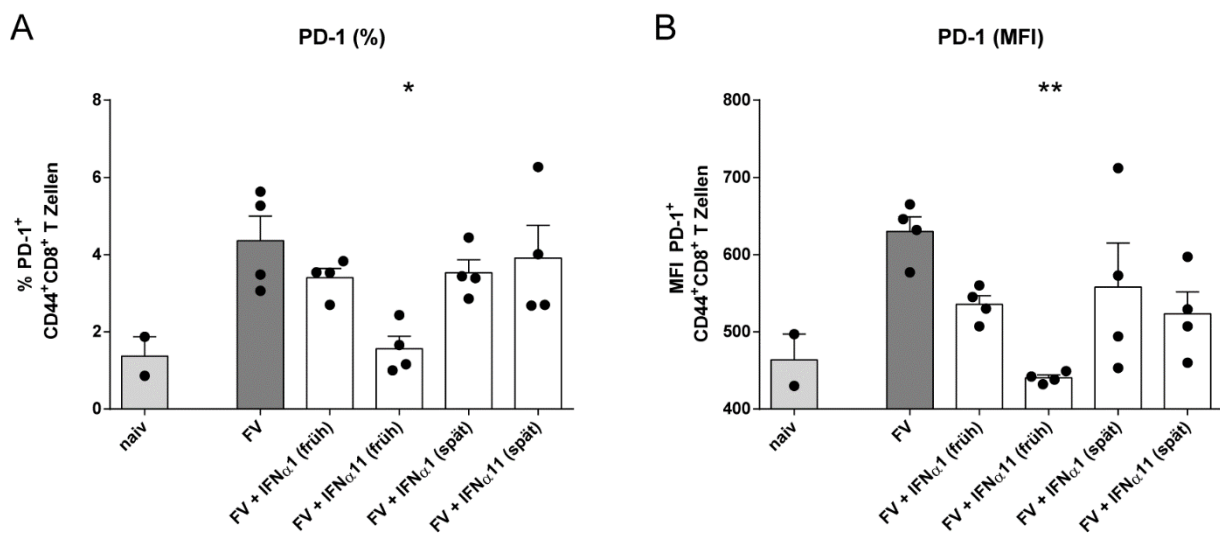


Abb. 4-30 Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf CD8 $^{+}$ T Zellen während der chronischen FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 40.000 SFFU FV + 100.000 FFU F-MuLV infiziert und entweder ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion (frühe Behandlung) oder ab dem 41. bis zum 49. Tag nach FV Infektion (späte Behandlung) mit den Subtypen IFN α 1 und IFN α 11 behandelt. 50 Tage nach Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Mittelwerte des Anteils PD-1-exprimierender CD8 $^{+}$ T Zellen (A), sowie die MFI der PD-1 Expression sind (B) sind als Balken (+SEM) dargestellt.

4.3.2.3 Immunmodulatorische Effekte der IFN α Subtyp Therapie auf regulatorische CD4 $^{+}$ T Zellen in der chronischen FV Infektion

Es konnte gezeigt werden, dass regulatorische CD4 $^{+}$ T Zellen in der späten Phase der akuten Infektion expandieren und somit die CD8 $^{+}$ T Zellantwort unterdrücken und

eine vollständige Viruseliminierung verhindern [45]. Daher sollte der Effekt der IFN α Subtyp Behandlung während der chronischen Infektion auf die regulatorischen CD4⁺ T Zellen aus der Milz durchflusszytometrisch untersucht werden.

In FV-infizierten unbehandelten Mäusen war die Anzahl an regulatorischen CD4⁺ T Zellen pro 10⁶ Lymphozyten von 22000 Zellen in naiven Mäusen auf 32500 Zellen in infizierten Mäusen angestiegen (Abb. 4-31 A). Die frühe Behandlung mit IFN α 1 bzw. IFN α 11 hatte keinen deutlichen Effekt auf die Anzahl regulatorischer CD4⁺ T Zellen und war vergleichbar mit der in unbehandelten, FV-infizierten Kontrollmäusen. In spät behandelten Mäusen waren mehr regulatorische CD4⁺ T Zellen in der Milz zu finden und lag gerechnet auf 10⁶ Lymphozyten mit 43000 Zellen in IFN α 1- bzw. 46000 Zellen in IFN α 11-behandelten Tieren höher als im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Aber diese Unterschiede waren nicht signifikant. Anschließend wurde die Aktivierung von regulatorischen CD4⁺ T Zellen, gemessen an der TNFR II Expression, untersucht (Abb. 4-31 B). In der chronischen FV Infektion kam es nur zu einer geringen Erhöhung des Anteils an aktivierten regulatorischen CD4⁺ T Zellen (55 %) im Vergleich zu naiven Tieren (50 %). Auch die frühe Behandlung mit den verschiedenen IFN α Subtypen veränderte diesen prozentualen Anteil kaum. Nur die späte Behandlung mit IFN α 11 führte zu einem leichten Anstieg aktivierter regulatorischer CD4⁺ T Zellen (64 %), was allerdings ebenfalls nicht signifikant war.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die frühe und späte Behandlung mit IFN α 1 und IFN α 11 nur einen geringfügigen Effekt auf die Antwort der regulatorischen CD4⁺ T Zellen hatte. Nur die späte Behandlung mit IFN α 11 hatte einen leichten Einfluss auf die regulatorischen CD4⁺ T Zellen, was durch eine leicht erhöhte Anzahl sowie Aktivierung messbar war.

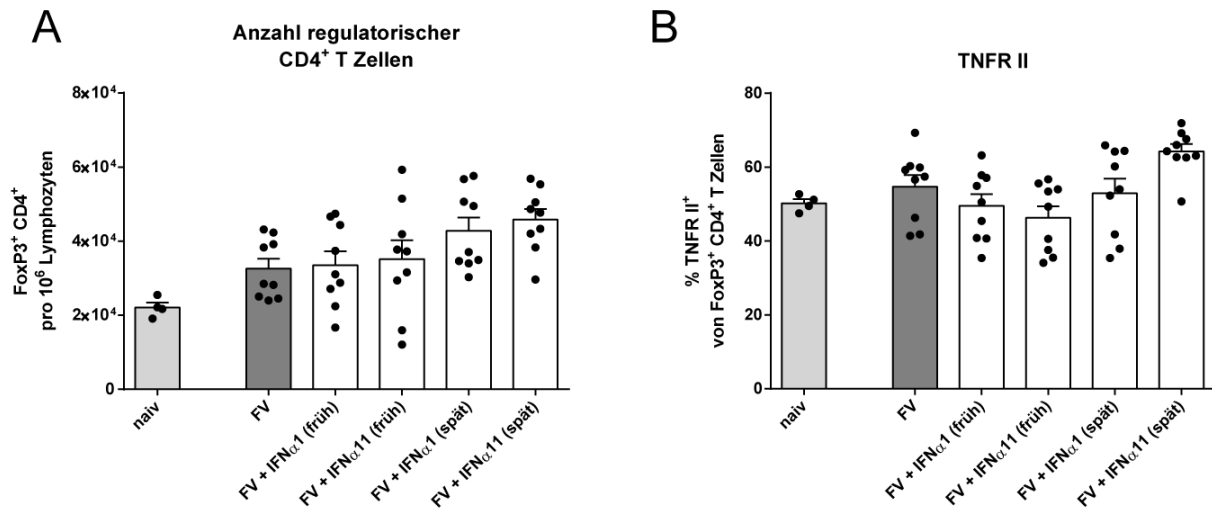


Abb. 4-31 Analyse von regulatorischen CD4⁺ T Zellen während der chronischen FV Infektion nach IFNα Subtyp Behandlung.

C57BL/6 Mäuse wurden mit 40.000 SFFU FV + 100.000 FFU F-MuLV infiziert und entweder ab dem 1. bis zum 9. Tag nach Infektion (frühe Behandlung) oder ab dem 41. bis zum 49. Tag nach FV Infektion (späte Behandlung) mit den Subtypen IFNα1 und IFNα11 behandelt. 50 Tage nach Infektion wurden lebendige Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Die Anzahl an regulatorischen FoxP3-positiven CD4⁺ T Zellen, sowie (B) der Anteil aktivierter regulatorischer CD4⁺ T Zellen gemessen an der Oberflächenexpression des Aktivierungsmarker TNFR II sind dargestellt. Mindestens 4 Mäuse pro Gruppe wurden in der chronischen Infektion untersucht. Die Mittelwerte (+SEM) sind als Balken dargestellt.

Bei Betrachtung der gesamten Daten aus den chronischen Versuchen, kann man feststellen, dass vor allem die frühe Behandlung mit IFNα11 einen Effekt auf die chronische FV Infektion hatte. Danach hatten die Mäuse eine geringere Viruslast, und der Anteil an PD-1-exprimierenden CD8⁺ T Zellen sowie die exprimierte Menge an PD-1 auf der Zelloberfläche wurde reduziert. Im Gegensatz dazu hatte die frühe Behandlung mit IFNα11 keinen Einfluss auf die Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen oder auf regulatorische CD4⁺ T Zellen. Eine leichte Verbesserung der Effektorfunktionen bei CD8⁺ T Zellen konnten nur nach der Behandlung mit IFNα11 in der späten Phase induziert werden, was mit einer Erhöhung der Eomes und GzmB Expression einherging. Allerdings hatte die späte IFNα11 Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der Viruslast.

5 Diskussion

Die frühe Expression von Typ I IFN ist ein wichtiger Abwehrmechanismus des angeborenen Immunsystems, um einen Wirt gegen virale Infektionen zu schützen. Sie werden innerhalb weniger Stunden nach der Infektion gebildet, wirken dabei autokrin und parakrin und induzieren die Expression von hunderten ISGs. Diese Genprodukte können sowohl antiviral, antiproliferativ, aber auch immunmodulatorisch wirken, indem sie die angeborene und die adaptive Immunzellantwort regulieren. Typ I IFN gehören zu einer großen Familie, die aus einer Vielzahl von IFN α Subtypen aber nur einem IFN β besteht. Obwohl die biologische Rolle der verschiedenen IFN α Subtypen immer noch diskutiert wird, weiß man, dass sie nicht redundant sind und unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. So besitzen viele verschiedene Wirbeltiere eine größere Anzahl an IFN α Subtypen, wie z.B. das Schwein (18 Subtypen), die Kuh (13 Subtypen), die Fledermaus (3 Subtypen), aber auch der Mensch (12 Subtypen) und die Maus (14 Subtypen) [245]. Das Vorhandensein zahlreicher Subtypen in verschiedenen Spezies und deren hohe intraspezifische Sequenzhomologie zeigt die biologische Bedeutung der verschiedenen Subtypen [233, 234]. In Abhängigkeit vom Zelltyp und Stimulus (z.B. Virus) werden unterschiedliche Expressionsmuster von IFN α Subtypen induziert [8]. Dabei werden nicht immer die IFN α Subtypen exprimiert, die eine starke antivirale Aktivität gegenüber dem übertragenen Virus besitzen. So wird während einer HIV Infektion v.a. IFN α 2 in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs, engl. *peripheral Blood mononuclear cells*) und plasmazytoiden DCs exprimiert [77, 124], von dem allerdings gezeigt werden konnte, dass es eine geringe antivirale Aktivität gegenüber HIV besitzt [119]. Viele andere Viren haben ebenfalls diverse Strategien entwickelt, um der IFN α Antwort komplett oder teilweise zu entgehen. Sie blockieren dabei entweder direkt die Produktion von IFN α , inhibieren IFN α -aktivierte Signalwege oder unterbinden die Funktion der exprimierten ISGs [184]. Daher stellt die exogene Gabe von IFN α als Immuntherapeutikum eine attraktive Möglichkeit dar, virale Infektionen zu behandeln. Heute wird in der Klinik ausschließlich IFN α 2 verwendet, um chronische Infektionen mit HBV und früher HCV zu therapieren [177]. Dabei liegen die Ansprechraten nach IFN α 2 Monotherapie bei weniger als 20 % [153, 176]. Und obwohl mit IFN α 2 kein breiter therapeutischer Effekt gegen diverse

Viruserkrankungen erzielt werden konnte, wird dieser Subtyp auch heute noch in vielen klinischen Studien (u.a. HIV) auf seine Wirksamkeit getestet [19, 172]. Dabei wird völlig außer Acht gelassen, dass alle IFN α Subtypen unterschiedliche biologische Funktionen innehaben.

5.1 Der antiproliferative Effekt verschiedener IFN α Subtypen *in vitro*

Zunächst wurde die antiproliferative Aktivität von 7 verschiedenen murinen IFN α Subtypen in einem FV-spezifischen CD8 $^{+}$ T Zell Proliferationstest ermittelt. Hier konnte gezeigt werden, dass alle IFN α Subtypen in der Lage waren die Expansion Antigen-spezifischer CD8 $^{+}$ T Zellen zu inhibieren, wobei starke Unterschiede in der antiproliferativen Kapazität zwischen den einzelnen IFN α Subtypen zu erkennen waren. Eine der ersten beschriebenen Funktionen von IFN α war der antiproliferative Effekt, also die Fähigkeit die Zellteilung zu inhibieren [130]. Allerdings wurde in anderen Studien gezeigt, dass IFN α auch einen positiven Effekt auf die Expansion von T Zellen haben kann und gleichzeitig die Differenzierung zu Effektor CD8 $^{+}$ T Zellen unterstützt [83, 112]. So benötigen LCMV-spezifische CD8 $^{+}$ T Zellen Typ I IFN als drittes Signal, um effektiv expandieren zu können [2, 109]. Es wurde gezeigt, dass vor allem der Zeitpunkt zu dem CD8 $^{+}$ T Zellen mit IFN α in Kontakt kommen, einen großen Effekt auf die Proliferation haben soll [30]. So wurde berichtet, dass eine Stimulation von Mäusen mit Poly (I:C), welches die Expression von Typ I IFN induziert, 24 bis 48 h vor LCMV Infektion zu einer reduzierten Proliferationskapazität von zuvor adoptiv transferierten Antigen-spezifischen CD8 $^{+}$ T Zellen führte. Dieser Effekt war allerdings nur transient, da die Stimulation 72 h vor Infektion keinen Effekt mehr zeigte und IFN-stimulierte CD8 $^{+}$ T Zellen, ähnlich wie unbehandelte CD8 $^{+}$ T Zellen, proliferierten [218]. Je nachdem, ob also zuerst die Aktivierung des Typ I IFN Signalwegs, oder die Aktivierung von CD8 $^{+}$ T Zellen durch die Induktion des TCR Signalweges stattfindet, hat IFN α einen pro- oder antiproliferativen Effekt [219]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass der antiproliferative Effekt davon abhängt, ob naive CD8 $^{+}$ T Zellen oder CD8 $^{+}$ T Zellen nach Antigenkontakt mit IFN α stimuliert werden. So förderte IFN α die Expansion von anti-CD3/CD28 aktivierten humanen naiven CD8 $^{+}$ T Zellen und induzierte deren Differenzierung zu Effektorzellen. Im Gegensatz dazu wirkte die Stimulation von CMV-spezifischen CD8 $^{+}$ T Zellen mit IFN α zwar ebenfalls positiv auf die Effektorfunktionen, inhibierte

aber gleichzeitig deren Expansion [86]. Interessanterweise zeigten die in dieser Studie verwendeten humanen Subtypen IFN α 2b und IFN α 5 diesbezüglich keinen Unterschied. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Stärke des antiproliferativen Effekts von IFN α davon abhängt, welcher Subtyp zur Stimulation verwendet wurde (Abb. 4-1 A+B). Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen unterschiedliche antiproliferative Effekte diverser Typ I IFN gezeigt wurden. So war die Inhibition der Zellteilung von PBMCs aus Patienten mit adulter T Zell Leukämie stärker, wenn sie *ex vivo* mit IFN β stimuliert wurden, als mit IFN α 2 [41]. Eine andere Studie, die den Effekt verschiedener humaner IFN α Subtypen auf die Proliferation von primären B Zellen untersuchte, zeigte einen pro-proliferativen Effekt von IFN α auf B Zellen, wobei IFN α 8 den stärksten Effekt hatte [87]. Weiterhin hatten humanes IFN α 5 und IFN α 8 den stärksten inhibierenden Effekt auf das Wachstum humaner Leberzelllinien, IFN α 1 hingegen den geringsten [236].

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Effekte der einzelnen IFN α Subtypen wurde durch Lavoie und Kollegen beschrieben [121]. Sie zeigten, dass die unterschiedliche antiproliferative Wirkung aller 12 humanen IFN α Subtypen mit der jeweiligen Bindungsaffinität zum IFNAR korrelierte. Man fand heraus, dass höhere Bindungsaffinitäten mit stärkeren antiproliferativen Effekten zusammenhingen und dies konnte sowohl für eine humane Ovarialzelllinie (OVCAR-3) als auch in einer Embryonalzelllinie (WISH) gezeigt werden.

Die diversen biologischen Effekte von IFN α sind zudem davon abhängig, welcher Zelltyp stimuliert wird und über welche Typ I IFN-induzierten Signalwege es wirkt [37, 147, 219]. Es konnte gezeigt werden, dass IFN α durch die Bindung von IFNAR alle STAT Moleküle und darüber hinaus weitere Signalmoleküle (u.a. p38 und p44/42 (Erk1/2)) aktivieren kann [32, 47, 182]. In T Zellen wurde explizit gezeigt, dass die antiproliferativen Effekte von IFN α vor allem durch die Aktivierung von STAT-1 und STAT-2 induziert werden [21, 58, 68]. STAT-3 ist nur in Abwesenheit von STAT-1 und STAT-2 an der Hemmung der Proliferation beteiligt [68]. Geringe STAT-1 Level in CD8⁺ T Zellen sind zudem mit einer erhöhten Proliferationskapazität von CD8⁺ T Zellen assoziiert [67]. Im Gegensatz dazu fördert die Phosphorylierung von STAT-4 die CD8⁺ T Zell Proliferation [35, 158]. In humanen primären Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit IFN α die Phosphorylierung von STAT-5 induzierte und dies zu einer gesteigerten Proliferation führte [70]. In anti-CD3

aktivierten murinen CD4⁺ T Zellen wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass Typ I IFN zwei gegensätzliche Signalwege induzieren, nämlich entweder die Aktivierung von STAT-1 oder STAT-3 und STAT-5. Wird der STAT-1 Signalweg aktiviert, werden vor allem antiproliferative und pro-apoptotische Antworten induziert [214]. Im Gegensatz dazu sollen STAT-3 und STAT-5 eher antiapoptotische und pro-proliferative Antworten induzieren und fördern somit das Überleben und Expansion von CD4⁺ T Zellen [214].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass stark antiproliferativ wirkende IFN α Subtypen, wie z.B. IFN α 6 und IFN α 9, auch verstärkt die Phosphorylierung von STAT-1 und STAT-2 induzierten (Abb. 4-1 B, Abb. 4-19). Im Gegensatz dazu war die Phosphorylierung dieser beiden STATs in der unbehandelten Kontrolle oder in den gering antiproliferativ wirkenden IFN α 1- und IFN α 2-stimulierten Zellen kaum nachweisbar. Dafür konnte in diesen Ansätzen eine erhöhte Phosphorylierung von STAT-5 gezeigt werden, was mit Überleben und Zellproliferation assoziiert wird. Es konnte also gezeigt werden, dass die verschiedenen murinen IFN α Subtypen unterschiedliche antiproliferative Effekte auf CD8⁺ T Zellen hatten und STAT Moleküle ebenfalls Subtyp-spezifisch aktiviert wurden.

Interessanterweise wurde der antiproliferative Effekt entweder durch direkte IFN α Subtyp Stimulation von CD8⁺ T Zellen vermittelt oder indirekt durch DCs (Abb. 4-15 B). In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass der antiproliferative Effekt von IFN α nicht unbedingt die direkte Stimulation jeder Zelle benötigt. Das Wachstum konnte auch indirekt durch Zell-Zell-Kontakt inhibiert werden. Dabei kam es nicht darauf an, dass die Zellen zum gleichen Zelltyp gehörten. So induzierten u.a. IFN α - oder IFN β -behandelte humane WISH Zellen eine Reduktion der Proliferation von murinen lymphoblastischen L1210 Zellen [133]. Dies könnte auch in der vorliegenden Arbeit ein Grund dafür sein, dass der antiproliferative Effekt von den DCs auf die CD8⁺ T Zellen übertragen werden konnte.

5.2 Immunmodulatorische Effekte der IFN α Subtypen

In verschiedenen Studien hat man bereits versucht, die exakten immunmodulatorischen Funktionen der IFN α Therapie aufzuschlüsseln. Die Modulation von T Zellantworten während der IFN α 2 Therapie von HBV und HCV werden kontrovers diskutiert [40, 53]. Bei kinetischen Untersuchungen der HCV

Replikation konnte gezeigt werden, dass in der ersten Phase während der IFN α 2 Therapie der virale RNA Titer rapide sinkt. Dies führte man auf die direkt antiviralen Effekte von IFN α zurück [156, 188]. Dennoch, eine Heilung kann nur in der späten Phase der IFN α 2 Therapie erzielt werden. Während manche Studien eine erfolgreiche Therapie mit HCV-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T Zellen [118, 155] oder CD4⁺ T Zellen [11, 102, 103] assoziieren, zeigten andere Studien, dass ein virologisches Ansprechen (*sustained virological response*) auf die antivirale Therapie nicht mit der verstärkten Aktivierung von HCV-spezifischen T Zellantworten zusammenhängt [183]. Während der Therapie einer chronischen HBV Infektion wurde ebenfalls gezeigt, dass die Verabreichung von IFN α 2, kombiniert mit einer effektiven Nukleos(t)idinhibitor Behandlung, die Aktivierung von HBV-spezifischen CD4⁺ T Zellen induzierte - ein Zusammenhang mit einer Heilung konnte hier jedoch nicht festgestellt werden [210]. Andere HBV Studien haben dagegen gezeigt, dass IFN gar keinen Effekt auf T Zellen, allerdings auf NK Zellen, hatte [145, 175]. Im Gegensatz dazu rief die Behandlung mit murinem IFN α 4 in HBV infizierten Mäusen eine effektive CD4⁺ und CD8⁺ T Zellantwort hervor, während IFN α 5 diesbezüglich nur geringe Effekte hatte [208]. So konnten mit IFN α 4 sowohl die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IFN γ , IL-2 und TNF α , gesteigert werden, als auch die Expression von GzmB als zytotoxisches Effektormolekül. Interessanterweise führte die Kombinationstherapie mit IFN α 4- und IFN α 5-kodierenden Plasmiden zu einer massiven Reduktion der HBV DNA im Serum und einer verbesserten CD8⁺ T Zell Antwort, als die jeweilige Monotherapie. Außerdem konnte eine deutlich verbesserte NK Zellantwort induziert werden.

Die Therapie von HIV-infizierten Patienten mit IFN α 2 wird ebenfalls kontrovers diskutiert [19, 46], wobei es gegensätzliche Erkenntnisse über deren immunmodulatorischen Eigenschaften gibt. Manche Studien zeigen, dass die Behandlung mit IFN α eine Hyperimmunaktivierung von CD4⁺ T Zellen induziert, die mit dem Fortschreiten der Krankheit assoziiert wird [24]. Zu ähnlichen Erkenntnissen ist man auch in Experimenten mit HIV-infizierten humanisierten Mäusen gekommen: Die Blockierung der Typ I IFN-induzierten Signalwege führte zur Wiederherstellung der T Zellfunktionen, wodurch eine Reduktion der HIV Replikation induziert werden konnte [26, 244]. Die Verabreichung von IFN α 2 in SIV-infizierten Primaten führte zwar zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast, ein Effekt auf die Immunantwort oder auch eine Hyperimmunaktivierung konnte jedoch nicht gemessen werden [222].

Andere Studien haben im Gegensatz dazu gezeigt, dass die Verabreichung von IFN α 2 in Therapie-naiven HIV Patienten die Aktivierung von CD8 $^{+}$ T Zellen förderte, während CD4 $^{+}$ T Zellen nicht darauf ansprachen, was aber gleichzeitig zu einer Reduktion der Viruslast führte [139]. Die erfolgreiche HCV Therapie (*sustained virological response*) mit Ribavirin und IFN α 2 in HIV und HCV koinfizierten Patienten korrelierte mit einer erhöhten Expression von CD127, ein Marker für Effektor Gedächtnis T Zellen, und gleichzeitig geringerer Dysfunktionalität und verbesserter Proliferation von HIV- und HCV-spezifischen CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T Zellen [105]. Die Therapie von chronisch FV-infizierten Mäusen mit CpG- und Viruspeptid-beladenen Nanopartikeln rief eine effiziente zytotoxische CD8 $^{+}$ T Zellantwort hervor, wodurch die Viruslast deutlich gesenkt werden konnte. Nachweislich war die Ausschüttung von IFN α und die Aktivierung Typ I IFN-induzierter Signalwege hierfür verantwortlich (persönlich mitgeteilte Daten). Lavender und Kollegen zeigten, dass die Therapie mit IFN α 14, aber nicht mit dem in der Klinik verwendeten Subtyp IFN α 2, die Viruslast in HIV-infizierten humanisierten Mäusen signifikant senkte und zu keiner Hyperimmunaktivierung führte [119]. Allerdings wurde in dieser Studie ein aktivierender Effekt auf die NK Zellantwort durch IFN α 14 berichtet. Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung mit IFN α 2 in einer verstärkten Hyperimmunaktivierung, gezeigt durch die gesteigerte Expression von HLA-DR (humane Leukozytenantigen DR), GzmB und CD107a (Degranulationsmarker) in CD8 $^{+}$ T Zellen. Daher gibt es deutliche Hinweise darauf, dass die Verwendung des richtigen IFN α Subtyps der Schlüssel zu einer erfolgreichen Therapie darstellt. So konnte auch in akut FV-infizierten Mäusen gezeigt werden, dass die Behandlung mit den Subtypen IFN α 1, IFN α 4, IFN α 9 und IFN α 11 zu einer signifikanten Reduktion der Viruslast führte, wohingegen die Subtypen IFN α 2 und IFN α 5 keinen Effekt zeigten [61, 65]. Eine erfolgreiche Behandlung mit den verschiedenen Subtypen war dabei entweder mit der Expression von antiviralen ISGs verbunden (IFN α 6 und IFN α 11) [61, 65], mit der Aktivierung von NK Zellen (IFN α 11) [65] oder einer verbesserten CD8 $^{+}$ T Zellantwort (IFN α 1) [61].

In der vorliegenden Arbeit sollte der individuelle immunmodulatorische Effekt von IFN α Subtypen auf CD8 $^{+}$ T Zellantworten genauer untersucht werden. IFN α wirkt als drittes Signal auf CD8 $^{+}$ T Zellen und steigert die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (wie z.B. IFN γ), sowie von zytotoxischen Molekülen wie Perforin oder Granzym [9, 33, 34, 35, 142, 158]. Dies stimmt mit den beobachteten *in*

vitro Effekten der IFN α Subtyp Stimulation von CD8⁺ T Zellen in der vorliegenden Arbeit überein, in der eine Induktion von IFN γ , IL-2 und TNF α gemessen werden konnte (Abb. 4-4). Die Expression von GzmB wurde ebenfalls gesteigert und war mit der verbesserten Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen verbunden (Abb. 4-8, Abb. 4-16 und Abb. 4-17). Diese Effekte waren, wie die antiproliferativen, ebenfalls IFN α subtypspezifisch. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine andere Studie, in der verschiedene humane IFN α Subtypen unterschiedliche Zytokinantworten in T Zellen induzierten. Hierfür wurden PBMCs *in vitro* mit IFN α Subtypen und anschließend mit dem Enterotoxin B des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stimuliert. Subtypabhängig wurden unterschiedliche Level an IFN γ , IL-2 und IL-4 in CD4⁺ T Zellen gemessen, wobei IFN α 8 und IFN α 10 die größten Effekte zeigten [89]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine Korrelation zwischen der Expression von Zytokinen und dem antiproliferativen Effekt jedes einzelnen Subtyps festgestellt werden (Abb. 4-5). Ein Zusammenhang zwischen antiproliferativer Kapazität und antiviralem Effekt gegen das Vaskuläre Stomatitisvirus (VSV) konnte von verschiedenen humanen IFN α Subtypen gezeigt werden. Dabei hatten IFN α 5 und IFN α 8 jeweils größere Effekte als IFN α 1 [235, 236].

Ein weiterer Faktor für eine effiziente Aktivierung von CD8⁺ T Zellen ist die indirekte Stimulation durch DCs [134, 148, 193]. Die Induktion einer effektiven CD8⁺ T Zellantwort wird also nicht nur durch die direkte Wirkung von IFN α auf CD8⁺ T Zellen vermittelt sondern auch indirekt durch die gesteigerten IFN α -induzierten Effektorfunktionen von DCs [134, 185]. Somit stellen DCs die wichtigste zelluläre Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar. Es ist bekannt, dass die Reifung und funktionale Aktivierung von DCs von Typ I IFN abhängig ist [148]. So verstärken sie die Antigenpräsentation von DCs durch die anhaltende Expression von MHC I und MHC II [205]. Der autokrine Effekt von IFN α und IFN β ist zudem wichtig für die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle und Zytokine, was schließlich für eine optimale T Zellaktivierung sorgt [148]. Typ I IFN induzieren außerdem die Produktion und Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen in DCs, wie z.B. IL-15 und IFN γ [144, 148]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die gesteigerte Maturierung (MHC II Expression) und Aktivierung (erhöhte Expression von CD80 und CD86) von DCs durch die Stimulation mit IFN α Subtypen gemessen werden (Abb. 4-9 und Abb. 4-10). Die Stärke dieser Effekte variierte in Abhängigkeit vom IFN α Subtyp. Rouzaut und Kollegen konnten keinen Unterschied zwischen den

humanen Subtypen IFN α 2 und IFN α 5 bezüglich der Modulation von DCs beobachten. Die beiden getesteten Subtypen verstärkten zwar die Migrationskapazität von DCs, ausgelöst durch die verstärkte Expression von CCR5 und CCR7, hatten dabei jedoch einen vergleichbaren Effekt [191]. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Transkriptomanalyse nach Stimulation von humanen, aus Monozyten-differenzierten DCs mit IFN β , IFN ω , IFN α 1, IFN α 2, IFN α 8 und IFN α 21 beschrieben [60]. Eine erhöhte Expression diverser Chemokine und Oberflächenmarker auf DCs wurde festgestellt, welche allerdings zu keiner verbesserten Aktivierung von CD4⁺ oder CD8⁺ T Zellen führte. Im Gegensatz dazu konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen der Aktivierung von DCs und der Induktion der Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen (TNF α Produktion) beobachtet werden (Abb. 4-13 E). Zu ähnlichen Ergebnissen ist man auch schon zuvor gekommen. So wirken Typ I IFN, stimuliert durch β -Glucane von Pilzen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* autokrin auf DCs (MHC I, CD86 und CD40), was mit einer gesteigerten Aktivierung von CD8⁺ T Zellen einherging (Proliferation, IFN γ und GzmB Produktion) [82].

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die *in vitro* IFN α Subtyp Stimulation zusätzlich die Produktion von IL-6 in DCs angeregt (Abb. 4-14 A+B). IL-6 wird normalerweise nicht als typisches Zytokin beschrieben, welches durch IFN in DCs exprimiert wird. In wenigen Arbeiten konnte allerdings ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von IFNAR und der Produktion von IL-6 in DCs gefunden werden [136, 237]. So wurde durch die *in vitro* Typ I IFN Stimulation von aus Monozyten-differenzierten DCs sowohl die Expression von IL-6 hochreguliert als auch von IL-1 β und IL-8 [136]. An anderer Stelle konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung Typ I IFN-induzierter Signalwege die Produktion von IL-6 in DCs stimulierte. Allerdings war die alleinige Stimulation von DCs mit rekombinanten IFN α oder IFN β nicht ausreichend, damit DCs große Mengen an IL-6 exprimierten, sondern benötigte die vorherige Aktivierung von TLR Signalwegen [237]. Auch in der vorliegenden Arbeit war ein direkter Zusammenhang zwischen IFN α Subtyp Stimulation und der Produktion von IL-6 in DCs zu erkennen. Interessanterweise konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass IL-6 wichtig für die Aktivierung von T Zellen ist, um supprimierende Effekte, die durch regulatorische CD4⁺ T Zellen vermittelt werden, zu entgehen [171].

IL-12 kann ebenfalls als drittes Signal auf CD8⁺ T Zellen wirken, indem es die Effektorfunktionen und Zytotoxizität von CD8⁺ T Zellen steigert [33, 34, 197]. Einer der Hauptproduzenten von IL-12 sind DCs [135]. Deshalb wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die *in vitro* Stimulation mit IFN α Subtypen einen Einfluss auf die Expression von IL-12 hatte. Eine Induktion der IL-12 Expression konnte jedoch nicht gemessen werden, was durch frühere Daten bestätigt wird, da die Ausschüttung von IL-12 durch Typ I IFN inhibiert werden kann [23, 29].

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die IFN α Subtyp-induzierten Effektorfunktionen von CD8⁺ T Zellen *in vitro* indirekt durch IFN α Subtyp-stimulierte DCs induziert wurden (Abb. 4-15). Für die Induktion von IFN γ , IL-2 und TNF α in CD8⁺ T Zellen war eine direkte IFN Stimulation der DCs nötig. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von GzmB in CD8⁺ T Zellen und die daraus resultierenden verbesserten zytotoxischen Funktionen direkt durch die Stimulation mit IFN α Subtypen hervorgerufen. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass IFN α einen indirekten Effekt auf CD8⁺ T Zellen hat. Für dieses Experiment wurden WT und IFNAR^{-/-} LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen adoptiv in Mäuse transferiert, die anschließend mit dem LCMV infiziert wurden. Nachdem CD8⁺ T Zellen mit dem LCMV Peptid *ex vivo* stimuliert wurden, zeigten IFNAR^{-/-} LCMV-spezifische CD8⁺ T Zellen zwar geringere Level an GzmB, die IFN γ - und TNF α Antwort blieb jedoch unverändert [112]. In der vorliegenden Arbeit konnte die wichtige Rolle von IFN α Subtypen auf DCs herausgearbeitet werden und dass sie die Hauptmediatoren der Zytokinproduktion in CD8⁺ T Zellen sind. Interessanterweise konnte kürzlich *in vivo* im MVA-Ova (engl. *Modified vaccinia virus Ankara*) Modell gezeigt werden, dass CD8⁺ T Zellen durch die Ausschüttung diverser Chemokine selbst dafür sorgen, dass konventionelle und plasmazytoide DCs zur Entzündungsstelle gelockt werden. Hier angekommen, produzieren plasmazytoide DCs vor allem große Mengen an Typ I IFN, wodurch konventionelle DCs stimuliert werden, die letztendlich für die optimale Aktivierung von CD8⁺ T Zellen sorgen. IFNAR^{-/-} CD8⁺ T Zellen zeigten in diesem Zusammenhang keine signifikante Verschlechterung der Effektorfunktionen, wodurch deutlich wird, dass der Effekt von Typ I IFN auf DCs auch hier von großer Bedeutung ist [20]. Diese Daten und die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse der DC-analysierten Experimente liefern wichtige Informationen für die Verbesserung von IFN α Subtyp Therapien oder auch als Kombination für DC-basierte Immuntherapien. *Ex vivo* mit verschiedenen

Antigenen beladene autologe DCs können z.B. einen Schutz gegenüber einer Vielzahl von Infektionen vermitteln [54, 59, 113]. So wurde in verschiedenen Mausexperimenten gezeigt, dass die Immunisierung mit DCs (beladen mit HIV Lysaten, HIV Glykoproteinen oder inaktiviertem Virus) mit einer potenten gegen HIV gerichteten Immunantwort einherging (u.a. gesteigerte Antikörper- und CD8⁺ T Zellantworten) [3, 117, 239].

In der vorliegenden Arbeit führte die *in vivo* Behandlung mit verschiedenen IFN α Subtypen (IFN α 1, IFN α 4, IFN α 6 und IFN α 11) zu einer Reduktion der Viruslast während der akuten FV Infektion. Die Charakterisierung der CD8⁺ T Zellantworten während der akuten FV Infektion zeigte allerdings keine signifikanten Veränderungen (Aktivierung, Zytokinexpression, Anzahl FV-spezifischer CD8⁺ T Zellen) nach Behandlung mit IFN α Subtypen (Abb. 4-23 und Abb. 4-24). Die Verwendung einer ISRE-eGFP Reportermaus zeigte jedoch, dass während der akuten FV Infektion in IFN α Subtyp-behandelten Mäusen CD8⁺ T Zellen direkt von IFN α Subtypen stimuliert wurden und in GzmB-exprimierenden CD8⁺ T Zellen der Typ I IFN Signalweg nach Behandlung mit den getesteten Subtypen IFN α 5 und IFN α 11 im Vergleich zu unbehandelten Mäusen verstärkt aktiviert war (Abb. 4-27). In einem *in vivo* Zytotoxizitätsassay in uninfizierten Mäusen wirkte IFN α 4 direkt auf CD8⁺ T Zellen und die Behandlung führte zu einer signifikanten Verbesserung der zytotoxischen Funktionen. CD8⁺ T Zellen eliminierten nach IFN α 4 Behandlung deutlich mehr FV-spezifische Zielzellen als unbehandelte CD8⁺ T Zellen (Abb. 4-17). Ein direkter immunmodulatorischer Effekt durch IFN α 4 konnte hier also beobachtet werden. Eine Erklärung, weshalb die *in vivo* Behandlung mit IFN α Subtypen in akut FV-infizierten Mäusen keinen Effekt auf die CD8⁺ T Zellantwort hatte, liegt möglicherweise an der vorangegangenen verstärkten Aktivierung von NK Zellen. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit IFN α 11 (nicht aber mit den hier getesteten Subtypen IFN α 2 oder IFN α 5) direkt auf NK Zellen wirkte, deren Aktivierung induzierte, was letztendlich zu gesteigerten zytotoxischen Effektorfunktionen und zu der verbesserten Eliminierung von FV-infizierten Zellen führte [65].

In chronisch infizierten Patienten mit HBV oder HCV ist die Virus-spezifische CD8⁺ T Zellantwort dysfunktional, was mit einer verminderten Proliferationskapazität, einer schlechteren Zytokinproduktion und geringerer zytotoxischer Aktivität einhergeht [17, 209]. Ähnliche CD8⁺ T Zellantworten kann man auch während der chronischen

Infektion mit HIV im Menschen oder SIV im Affen beobachten [72, 98, 167]. Vergleichbar mit dem FV Modell wird das LCMV (*Clone 13*) Modell verwendet, um in Mäusen während einer chronischen Virusinfektion Immunantworten zu untersuchen. Im Gegensatz zur FV Infektion können innerhalb der ersten 24 Stunden der LCMV Infektion hohe Typ I IFN Titer [164] und während der etablierten persistierenden Infektion hohe Level an ISGs gemessen werden [232]. Dabei induzieren Typ I IFN die Expression immunsuppressiver Gene, wie IL-10 und PD-1, welche die Dysfunktionalität von CD8⁺ T Zellen hervorrufen und somit die Etablierung einer chronischen Infektion unterstützen [215, 232]. Durch die Blockierung des Typ I IFN Signalwegs können die T Zellfunktionen wiederhergestellt werden und der Virustiter sinkt folglich. Interessanterweise zeigte sich erst später, dass IFN β und nicht IFN α für diese negativen Effekte verantwortlich war [157]. Auch während der chronischen FV Infektion sind CD8⁺ T Zellen dysfunktional und exprimieren gleichzeitig große Mengen des inhibitorischen Rezeptors PD-1 [43, 241]. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von PD-1 während der akuten FV Infektion auf aktivierten CD8⁺ T Zellen hochreguliert wird [242]. Dabei waren PD-1⁺ CD8⁺ T Zellen funktional, womit PD-1 während der akuten Infektion kein Marker für dysfunktionale CD8⁺ T Zellen darstellt. Während der chronischen FV Infektion zeigt sich jedoch ein anderes Bild: PD-1-exprimierende CD8⁺ T Zellen sind funktional eingeschränkt und produzieren nur geringe Mengen an Zytokinen und GzmB. Diese Dysfunktion wird einerseits durch die Expression von inhibitorischen Rezeptoren, wie PD-1 und Tim-3, andererseits durch die Expansion von regulatorischen CD4⁺ T Zellen induziert [43, 241]. Die Blockierung des PD-1/PD-L1-Signalwegs führte zudem zu verbesserten CD8⁺ T Zellantworten [43]. Der Effekt von IFN α auf die Expression von PD-1 wird gegensätzlich beschrieben: In einer Studie wurde gezeigt, dass sowohl Makrophagen (*in vitro*) als auch Antigen-spezifische CD8⁺ T Zellen (*in vitro* und *in vivo*) die Expression von PD-1 hochregulieren, wenn sie mit IFN α stimuliert werden [27, 216]. In Herpes-infizierten Mäusen hingegen führte die Behandlung mit Typ I IFN zur Induktion von IL-7, was wiederum die Expression von PD-1 suppressierte [90]. Die Aktivierung von Virus-spezifischen CD8⁺ T Zellantworten in chronischen Infektionen stellt also einen möglichen Ansatz einer erfolgreichen Virustherapie dar. Die exogene Behandlung mit IFN α 11 in der akuten Phase der FV Infektion wirkte langanhaltend, denn die signifikante Reduktion der Viruslast war auch während der chronischen Infektion messbar (Abb. 4-28). Hier hatte diese erfolgreiche Behandlung

interessanterweise gleichzeitig einen supprimierenden Effekt auf die PD-1 Expression. (Abb. 4-30). So wurde auch für LCMV gezeigt, dass durch die Verabreichung von Antikörpern, die den PD-1/PD-L1 Signalweg blockieren, CD8⁺ T Zellfunktionen wiederhergestellt werden, was schließlich zu einer Reduktion der Viruslast führt [10].

Im Gesamten hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass IFN α Subtypen diverse Effekte auf die Modulation von CD8⁺ T Zellantworten haben. Interessanterweise konnte durch *in vitro* Versuche gezeigt werden, dass die Verbesserung der IFN γ , IL-2 und TNF α Produktion in CD8⁺ T Zellen indirekt durch die Stimulation von DCs induziert wurde. Das gesteigerte Potential Zielzellen abzutöten, wurde durch einen *in vitro* und *in vivo* Zytotoxizitätstest belegt. Dabei war vor allem der direkte Effekt von IFN α Subtypen auf CD8⁺ T Zellen wichtig. Durch die therapeutische Behandlung von akut oder chronisch FV-infizierten Mäusen *in vivo* konnte allerdings keine erkennbare Verbesserung der CD8⁺ T Zell Effektorfunktionen beobachtet werden.

6 Zusammenfassungen

6.1 Zusammenfassung

Während der meisten viralen Infektionen ist die schnellste Immunantwort die Ausschüttung von Typ I Interferonen (IFN). Diese Zytokine induzieren einen antiviralen Status in infizierten und benachbarten Zellen, wirken antiproliferativ und modulieren Immunantworten. Weil viele Viren eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt haben, um der Typ I IFN Antwort zu entgehen, stellt deren exogene Gabe als Immuntherapeutikum eine attraktive Möglichkeit dar, um Virusinfektionen zu behandeln. Die Typ I IFN Familie besteht aus verschiedenen IFN α Subtypen (bis zu 14 in Mäusen), wobei deren biologische Relevanz noch immer erforscht wird. Heute weiß man, dass die verschiedenen IFN α Subtypen individuelle biologische Aktivitäten besitzen. Dennoch wird in der Klinik ausschließlich der Subtyp IFN α 2 verwendet. Während der direkte antivirale Effekt verschiedener Subtypen bereits in mehreren *in vitro* und *in vivo* Modellen erforscht wurde, ist deren immunmodulatorische Wirkung insbesondere auf Virus-spezifische CD8⁺ T Zellen noch weitestgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Effekt von ausgewählten IFN α Subtypen auf die CD8⁺ T Zellantworten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, mit Hilfe des Friend Retrovirus (FV) Modelles untersucht werden. In einem *in vitro* Proliferationstest konnte ein Subtyp-spezifischer antiproliferativer Effekt von IFN α auf FV-spezifische CD8⁺ T Zellen gezeigt werden, der mit gesteigerten Effektorfunktionen (Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Granzym B) korrelierte. Hier zeigten vor allem die Subtypen IFN α 4, IFN α 6 und IFN α 9 den stärksten Effekt. Bei der Untersuchung der Immunmodulation von IFN α Subtypen auf CD8⁺ T Zellen mit anderen Spezifitäten konnten vergleichbare Effekte beobachtet werden, woraus geschlossen werden kann, dass sie Antigen-unspezifisch sind. In einem FV Zytotoxizitätstest konnte zudem gezeigt werden, dass die zytotoxische Aktivität von IFN α Subtyp-behandelten CD8⁺ T Zellen verbessert war, mit IFN α 4 als potentester Subtyp. Funktionell konnte IFN α über die direkte Stimulation von CD8⁺ T Zellen oder die indirekte Stimulation von Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DC) wirken. Die Ausreifung sowie Aktivierung FV Antigen-beladener DCs durch IFN α Subtyp Stimulation wurde nachgewiesen. Dabei verbesserten IFN α Subtypen, die

einen starken Effekt auf CD8⁺ T Zellen hatten, den Phänotyp von DCs besonders effizient. So wurde die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in CD8⁺ T Zellen nicht durch die direkte Wirkung der IFN α Subtypen auf CD8⁺ T Zellen hervorgerufen, sondern wurde indirekt durch Stimulation der DCs vermittelt. Im Gegensatz dazu war eine IFN α Subtyp Stimulation von CD8⁺ T Zellen oder DCs ausreichend, um die antiproliferativen Effekte oder die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T Zellen zu verbessern.

Die Ergebnisse zeigen, dass individuelle IFN α Subtypen verschiedene Effekte auf die Funktionen von CD8⁺ T Zellen haben. Diese Daten liefern wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung oder Verbesserung von Immuntherapien von Virusinfektionen mit IFN α .

6.2 Summary

The type I interferon (IFN) expression is the immediate early host response against invading viruses. These cytokines induce an antiviral state in infected and neighboring cells, have an antiproliferative effect and can strongly modulate innate and adaptive immune responses. However, many viruses evolved numerous mechanisms to avoid the type I IFN response, thus their exogenous application as immunotherapeutic represents a powerful tool for treating viral infections. Type I IFN consist of multiple IFN α subtypes (up to 14 in mice), however their biological relevance is still under debate. It is well accepted that the different IFN α subtypes have individual biological activities, however in clinics only IFN α 2 is used. While in multiple *in vitro* and *in vivo* models the direct antiviral effect of different IFN α subtypes were already analyzed, the immunomodulatory impact on CD8⁺ T cells is largely unknown. In the present work the effects of selected IFN α Subtypes were investigated in more detail. Therefore, the well-established Friend retrovirus (FV) model was used. With the help of an *in vitro* proliferation assay subtype-specific antiproliferative effects on antigen-specific CD8⁺ T cells were observed, which correlated with improved effector functions (expression of pro-inflammatory cytokines and granzyme B). Here, IFN α 4, IFN α 6 and IFN α 9 showed the greatest effects. Investigating the immunomodulatory effect of IFN α subtypes on CD8⁺ T cells with other specificity, similar results could be observed indicating an antigen-unspecific effect. In FV-specific cytotoxicity assays IFN α subtypes enhanced cytolytic activity of

CD8⁺ T cells with IFN α 4 being the most potent subtype. IFN α acted by direct stimulation of CD8⁺ T cells or by indirect stimulation of antigen-presenting dendritic cells (DCs). IFN α subtypes augmented maturation and activation of FV antigen-loaded DCs. Thereby IFN α subtypes, which had strong effects on CD8⁺ T cells, efficiently improved the phenotype of DCs. Hence, expression of pro-inflammatory cytokines was not triggered by direct stimulation of CD8⁺ T cells but indirectly mediated by DCs. In contrast, antiproliferative effects and improved cytotoxic functions were affected by IFN α subtype stimulated CD8⁺ T cells or DCs.

These data reveal that individual IFN α subtypes have different effects on the functions of CD8⁺ T cells. This study provides important knowledge for the development and improvement of immunotherapies of viral infections with IFN α .

7 Literaturverzeichnis

1. Ahmad S., Alsayed Y.M., Druker B.J., Plataniias L.C. **The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor protein.** *J Biol Chem* **272**, 29991-29994 (1997).
2. Aichele P., Unsoeld H., Koschella M., Schweier O., Kalinke U., Vucikujja S. **CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion.** *J Immunol* **176**, 4525-4529 (2006).
3. Aline F., Brand D., Bout D., Pierre J., Fouquenot D., Verrier B., Dimier-Poisson I. **Generation of specific Th1 and CD8+ T-cell responses by immunization with mouse CD8+ dendritic cells loaded with HIV-1 viral lysate or envelope glycoproteins.** *Microbes Infect* **9**, 536-543 (2007).
4. Alston B., Ellenberg J.H., Standiford H.C., Muth K., Martinez A., Greaves W., Kumi J. **A multicenter, randomized, controlled trial of three preparations of low-dose oral alpha-interferon in HIV-infected patients with CD4+ counts between 50 and 350 cells/mm(3). Division of AIDS Treatment Research Initiative (DATRI) 022 Study Group.** *J Acquir Immune Defic Syndr* **22**, 348-357 (1999).
5. Altman J.D., Moss P.A., Goulder P.J., Barouch D.H., McHeyzer-Williams M.G., Bell J.I., McMichael A.J., Davis M.M. **Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.** *Science* **274**, 94-96 (1996).
6. Bachmann M.F., Barner M., Viola A., Kopf M. **Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection.** *Eur J Immunol* **29**, 291-299 (1999).
7. Badovinac V.P., Porter B.B., Harty J.T. **Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection.** *Nat Immunol* **3**, 619-626 (2002).
8. Baig E., Fish E.N. **Distinct signature type I interferon responses are determined by the infecting virus and the target cell.** *Antivir Ther* **13**, 409-422 (2008).
9. Balian A., Naveau S., Zou W., Durand-Gasselin I., Bouchet L., Foussat A., Galanaud P., Chaput J.C., Emilie D. **Pretreatment expression of the perforin gene by circulating CD8(+) T lymphocytes predicts biochemical response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C.** *Eur Cytokine Netw* **11**, 177-184 (2000).
10. Barber D.L., Wherry E.J., Masopust D., Zhu B., Allison J.P., Sharpe A.H., Freeman G.J., Ahmed R. **Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection.** *Nature* **439**, 682-687 (2006).
11. Barnes E., Harcourt G., Brown D., Lucas M., Phillips R., Dusheiko G., Klenerman P. **The dynamics of T-lymphocyte responses during combination therapy for chronic hepatitis C virus infection.** *Hepatology* **36**, 743-754 (2002).
12. Barr S.D., Smiley J.R., Bushman F.D. **The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22.** *PLoS Pathog* **4**, e1000007 (2008).
13. Barry M., Bleackley R.C. **Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.** *Nat Rev Immunol* **2**, 401-409 (2002).

14. Bekisz J., Baron S., Balinsky C., Morrow A., Zoon K.C. **Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon.** *Pharmaceuticals (Basel)* **3**, 994-1015 (2010).
15. Biron C.A., Sonnenfeld G., Welsh R.M. **Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo.** *J Leukoc Biol* **35**, 31-37 (1984).
16. Bollati-Fogolin M., Muller W. **Virus free, cell-based assay for the quantification of murine type I interferons.** *J Immunol Methods* **306**, 169-175 (2005).
17. Boni C., Fisicaro P., Valdatta C., Amadei B., Di Vincenzo P., Giuberti T., Laccabue D., Zerbini A., Cavalli A., Missale G., Bertoletti A., Ferrari C. **Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection.** *Journal of virology* **81**, 4215-4225 (2007).
18. Borish L.C., Steinke J.W. **2. Cytokines and chemokines.** *J Allergy Clin Immunol* **111**, S460-475 (2003).
19. Bosinger S.E., Utay N.S. **Type I interferon: understanding its role in HIV pathogenesis and therapy.** *Current HIV/AIDS reports* **12**, 41-53 (2015).
20. Brewitz A., Eickhoff S., Dahling S., Quast T., Bedoui S., Kroczeck R.A., Kurts C., Garbi N., Barchet W., Iannacone M., Klauschen F., Kolanus W., Kaisho T., Colonna M., Germain R.N., Kastenmuller W. **CD8+ T Cells Orchestrate pDC-XCR1+ Dendritic Cell Spatial and Functional Cooperativity to Optimize Priming.** *Immunity* **46**, 205-219 (2017).
21. Bromberg J.F., Horvath C.M., Wen Z., Schreiber R.D., Darnell J.E., Jr. **Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7673-7678 (1996).
22. Buchbinder E.I., Desai A. **CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition.** *Am J Clin Oncol* **39**, 98-106 (2016).
23. Byrnes A.A., Ma X., Cuomo P., Park K., Wahl L., Wolf S.F., Zhou H., Trinchieri G., Karp C.L. **Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity.** *Eur J Immunol* **31**, 2026-2034 (2001).
24. Cha L., Berry C.M., Nolan D., Castley A., Fernandez S., French M.A. **Interferon-alpha, immune activation and immune dysfunction in treated HIV infection.** *Clin Transl Immunology* **3**, e10 (2014).
25. Chen W., Qin H., Chesebro B., Cheever M.A. **Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors.** *J Virol* **70**, 7773-7782 (1996).
26. Cheng L., Ma J., Li J., Li D., Li G., Li F., Zhang Q., Yu H., Yasui F., Ye C., Tsao L.C., Hu Z., Su L., Zhang L. **Blocking type I interferon signaling enhances T cell recovery and reduces HIV-1 reservoirs.** *J Clin Invest* **127**, 269-279 (2017).
27. Cho H.Y., Lee S.W., Seo S.K., Choi I.W., Choi I., Lee S.W. **Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-alpha-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages.** *Biochim Biophys Acta* **1779**, 811-819 (2008).
28. Conrad B. **Potential mechanisms of interferon-alpha induced autoimmunity.** *Autoimmunity* **36**, 519-523 (2003).

-
29. Cousens L.P., Orange J.S., Su H.C., Biron C.A. **Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 634-639 (1997).
 30. Crouse J., Kalinke U., Oxenius A. **Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons.** *Nat Rev Immunol* **15**, 231-242 (2015).
 31. Cull V.S., Bartlett E.J., James C.M. **Type I interferon gene therapy protects against cytomegalovirus-induced myocarditis.** *Immunology* **106**, 428-437 (2002).
 32. Cull V.S., Tilbrook P.A., Bartlett E.J., Brekalo N.L., James C.M. **Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: specificity of STAT activation.** *Blood* **101**, 2727-2735 (2003).
 33. Curtsinger J.M., Johnson C.M., Mescher M.F. **CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine.** *J Immunol* **171**, 5165-5171 (2003).
 34. Curtsinger J.M., Mescher M.F. **Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation.** *Curr Opin Immunol* **22**, 333-340 (2010).
 35. Curtsinger J.M., Valenzuela J.O., Agarwal P., Lins D., Mescher M.F. **Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation.** *J Immunol* **174**, 4465-4469 (2005).
 36. D'Souza W.N., Lefrancois L. **Frontline: An in-depth evaluation of the production of IL-2 by antigen-specific CD8 T cells in vivo.** *Eur J Immunol* **34**, 2977-2985 (2004).
 37. David M. **Signal transduction by type I interferons.** *Biotechniques Suppl*, 58-65 (2002).
 38. de Weerd N.A., Samarajiwa S.A., Hertzog P.J. **Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions.** *J Biol Chem* **282**, 20053-20057 (2007).
 39. Didierlaurent A.M., Collignon C., Bourguignon P., Wouters S., Fierens K., Fochesato M., Dendouga N., Langlet C., Malissen B., Lambrecht B.N., Garcon N., Van Mechelen M., Morel S. **Enhancement of adaptive immunity by the human vaccine adjuvant AS01 depends on activated dendritic cells.** *J Immunol* **193**, 1920-1930 (2014).
 40. Diepolder H.M. **Interferon-alpha for hepatitis C: antiviral or immunotherapy?** *J Hepatol* **40**, 1030-1031 (2004).
 41. Dierckx T., Khouri R., Menezes S.M., Decanine D., Farre L., Bittencourt A., Vandamme A.M., Van Weyenbergh J. **IFN-beta induces greater antiproliferative and proapoptotic effects and increased p53 signaling compared with IFN-alpha in PBMCs of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma patients.** *Blood Cancer J* **7**, e519 (2017).
 42. Dietze K.K., Zelinskyy G., Gibbert K., Schimmer S., Francois S., Myers L., Sparwasser T., Hasenkrug K.J., Dittmer U. **Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 2420-2425 (2011).
 43. Dietze K.K., Zelinskyy G., Liu J., Kretzmer F., Schimmer S., Dittmer U. **Combining regulatory T cell depletion and inhibitory receptor blockade improves reactivation of exhausted virus-specific CD8+ T cells and**

- efficiently reduces chronic retroviral loads.** *PLoS Pathog* **9**, e1003798 (2013).
44. Dittmer U., Hasenkrug K.J. **Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections.** *Curr Mol Med* **1**, 431-436 (2001).
45. Dittmer U., He H., Messer R.J., Schimmer S., Olbrich A.R., Ohlen C., Greenberg P.D., Stromnes I.M., Iwashiro M., Sakaguchi S., Evans L.H., Peterson K.E., Yang G., Hasenkrug K.J. **Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection.** *Immunity* **20**, 293-303 (2004).
46. Doyle T., Goujon C., Malim M.H. **HIV-1 and interferons: who's interfering with whom?** *Nat Rev Microbiol* **13**, 403-413 (2015).
47. Du Z., Wei L., Murti A., Pfeffer S.R., Fan M., Yang C.H., Pfeffer L.M. **Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: the NF-kappaB pathway.** *J Cell Biochem* **102**, 1087-1094 (2007).
48. Dudek A.M., Martin S., Garg A.D., Agostinis P. **Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity.** *Front Immunol* **4**, 438 (2013).
49. Egli A., Santer D.M., O'Shea D., Tyrrell D.L., Houghton M. **The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections.** *Emerg Microbes Infect* **3**, e51 (2014).
50. Engelman A., Cherepanov P. **The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights.** *Nat Rev Microbiol* **10**, 279-290 (2012).
51. Erlandsson L., Blumenthal R., Eloranta M.L., Engel H., Alm G., Weiss S., Leanderson T. **Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts.** *Current biology : CB* **8**, 223-226 (1998).
52. Evinger M., Rubinstein M., Pestka S. **Antiproliferative and antiviral activities of human leukocyte interferons.** *Arch Biochem Biophys* **210**, 319-329 (1981).
53. Feld J.J., Hoofnagle J.H. **Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C.** *Nature* **436**, 967-972 (2005).
54. Freitas-Silva R., Brelaz-de-Castro M.C., Pereira V.R. **Dendritic cell-based approaches in the fight against diseases.** *Front Immunol* **5**, 78 (2014).
55. Friend C. **Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia.** *J Exp Med* **105**, 307-318 (1957).
56. Fuller M.J., Zajac A.J. **Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads.** *J Immunol* **170**, 477-486 (2003).
57. Ganem D., Prince A.M. **Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences.** *N Engl J Med* **350**, 1118-1129 (2004).
58. Garcia-Sastre A., Biron C.A. **Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente.** *Science* **312**, 879-882 (2006).
59. Garcia F., Plana M., Climent N., Leon A., Gatell J.M., Gallart T. **Dendritic cell based vaccines for HIV infection: the way ahead.** *Hum Vaccin Immunother* **9**, 2445-2452 (2013).
60. Garcin G., Bordat Y., Chuchana P., Monneron D., Law H.K., Piehler J., Uze G. **Differential activity of type I interferon subtypes for dendritic cell differentiation.** *PLoS One* **8**, e58465 (2013).
61. Gerlach N., Gibbert K., Alter C., Nair S., Zelinskyy G., James C.M., Dittmer U. **Anti-retroviral effects of type I IFN subtypes in vivo.** *Eur J Immunol* **39**, 136-146 (2009).

-
62. Gerlach N., Schimmer S., Weiss S., Kalinke U., Dittmer U. **Effects of type I interferons on Friend retrovirus infection.** *J Virol* **80**, 3438-3444 (2006).
 63. Gibbert K., Dietze K.K., Zelinskyy G., Lang K.S., Barchet W., Kirschning C.J., Dittmer U. **Polyinosinic-polycytidylic acid treatment of Friend retrovirus-infected mice improves functional properties of virus-specific T cells and prevents virus-induced disease.** *Journal of immunology* **185**, 6179-6189 (2010).
 64. Gibbert K., Dittmer U. **Distinct antiviral activities of IFN-alpha subtypes.** *Immunotherapy* **3**, 813-816 (2011).
 65. Gibbert K., Joedicke J.J., Meryk A., Trilling M., Francois S., Dupbach J., Kraft A., Lang K.S., Dittmer U. **Interferon-alpha Subtype 11 Activates NK Cells and Enables Control of Retroviral Infection.** *PLoS pathogens* **8**, e1002868 (2012).
 66. Gibbert K., Schlaak J., Yang D., Dittmer U. **IFN-alpha subtypes: distinct biological activities in anti-viral therapy.** *British journal of pharmacology* **168**, 1048-1058 (2013).
 67. Gil M.P., Salomon R., Louten J., Biron C.A. **Modulation of STAT1 protein levels: a mechanism shaping CD8 T-cell responses in vivo.** *Blood* **107**, 987-993 (2006).
 68. Gimeno R., Lee C.K., Schindler C., Levy D.E. **Stat1 and Stat2 but not Stat3 arbitrate contradictory growth signals elicited by alpha/beta interferon in T lymphocytes.** *Mol Cell Biol* **25**, 5456-5465 (2005).
 69. Goldsby R.A., Goldsby R.A. **Immunology.** (2003).
 70. Gomez D., Reich N.C. **Stimulation of primary human endothelial cell proliferation by IFN.** *J Immunol* **170**, 5373-5381 (2003).
 71. Gonzalez-Navajas J.M., Lee J., David M., Raz E. **Immunomodulatory functions of type I interferons.** *Nature reviews. Immunology* **12**, 125-135 (2012).
 72. Gorantla S., Makarov E., Finke-Dwyer J., Gebhart C.L., Domm W., Dewhurst S., Gendelman H.E., Poluektova L.Y. **CD8+ cell depletion accelerates HIV-1 immunopathology in humanized mice.** *J Immunol* **184**, 7082-7091 (2010).
 73. Grander D., Sangfelt O., Erickson S. **How does interferon exert its cell growth inhibitory effect?** *Eur J Haematol* **59**, 129-135 (1997).
 74. Greaves M.F., Brown G. **A human B lymphocyte specific antigen.** *Nat New Biol* **246**, 116-119 (1973).
 75. Hardy M.P., Owczarek C.M., Jermini L.S., Ejdebäck M., Hertzog P.J. **Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes.** *Genomics* **84**, 331-345 (2004).
 76. Harper M.S., Barrett B.S., Smith D.S., Li S.X., Gibbert K., Dittmer U., Hasenkrug K.J., Santiago M.L. **IFN-alpha treatment inhibits acute Friend retrovirus replication primarily through the antiviral effector molecule Apobec3.** *Journal of immunology* **190**, 1583-1590 (2013).
 77. Harper M.S., Guo K., Gibbert K., Lee E.J., Dillon S.M., Barrett B.S., McCarter M.D., Hasenkrug K.J., Dittmer U., Wilson C.C., Santiago M.L. **Interferon-alpha Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms.** *PLoS pathogens* **11**, e1005254 (2015).
 78. Hartmann K. **Feline immunodeficiency virus infection: an overview.** *Vet J* **155**, 123-137 (1998).

-
79. Hasenkrug K.J. **Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice.** *J Virol* **73**, 6468-6473 (1999).
 80. Hasenkrug K.J., Brooks D.M., Dittmer U. **Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice.** *J Virol* **72**, 6559-6564 (1998).
 81. Hasenkrug K.J., Chesebro B. **Immunity to retroviral infection: the Friend virus model.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7811-7816 (1997).
 82. Hassanzadeh-Kiabi N., Yanez A., Dang I., Martins G.A., Underhill D.M., Goodridge H.S. **Autocrine Type I IFN Signaling in Dendritic Cells Stimulated with Fungal beta-Glucans or Lipopolysaccharide Promotes CD8 T Cell Activation.** *J Immunol* **198**, 375-382 (2017).
 83. Havenar-Daughton C., Kolumam G.A., Murali-Krishna K. **Cutting Edge: The direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection.** *J Immunol* **176**, 3315-3319 (2006).
 84. Hengel H., Koszinowski U.H., Conzelmann K.K. **Viruses know it all: new insights into IFN networks.** *Trends Immunol* **26**, 396-401 (2005).
 85. Hervas-Stubbs S. **Direct effects of type I interferons on cells of the immune system.** *Clin. Cancer Res.* **17**, 2619-2627 (2011).
 86. Hervas-Stubbs S., Riezu-Boj J.I., Gonzalez I., Mancheno U., Dubrot J., Azpilicueta A., Gabari I., Palazon A., Aranguren A., Ruiz J., Prieto J., Larrea E., Melero I. **Effects of IFN-alpha as a signal-3 cytokine on human naive and antigen-experienced CD8(+) T cells.** *Eur J Immunol* **40**, 3389-3402 (2010).
 87. Hibbert L., Foster G.R. **Human type I interferons differ greatly in their effects on the proliferation of primary B cells.** *J Interferon Cytokine Res* **19**, 309-318 (1999).
 88. Hilkens C.M., Schlaak J.F., Kerr I.M. **Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells.** *Journal of immunology* **171**, 5255-5263 (2003).
 89. Hillyer P., Raviv N., Gold D.M., Dougherty D., Liu J., Johnson T.R., Graham B.S., Rabin R.L. **Subtypes of type I IFN differentially enhance cytokine expression by suboptimally stimulated CD4(+) T cells.** *Eur J Immunol* **43**, 3197-3208 (2013).
 90. Hou L., Jie Z., Liang Y., Desai M., Soong L., Sun J. **Type 1 interferon-induced IL-7 maintains CD8+ T-cell responses and homeostasis by suppressing PD-1 expression in viral hepatitis.** *Cell Mol Immunol* **12**, 213-221 (2015).
 91. Hunter C.A., Gabriel K.E., Radzanowski T., Neyer L.E., Remington J.S. **Type I interferons enhance production of IFN-gamma by NK cells.** *Immunology letters* **59**, 1-5 (1997).
 92. Huthoff H., Towers G.J. **Restriction of retroviral replication by APOBEC3G/F and TRIM5alpha.** *Trends Microbiol* **16**, 612-619 (2008).
 93. Hwang S.Y., Hertzog P.J., Holland K.A., Sumarsono S.H., Tymms M.J., Hamilton J.A., Whitty G., Bertoncello I., Kola I. **A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11284-11288 (1995).

-
94. Intlekofer A.M., Takemoto N., Wherry E.J., Longworth S.A., Northrup J.T., Palanivel V.R., Mullen A.C., Gasink C.R., Kaech S.M., Miller J.D., Gapin L., Ryan K., Russ A.P., Lindsten T., Orange J.S., Goldrath A.W., Ahmed R., Reiner S.L. **Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin.** *Nat Immunol* **6**, 1236-1244 (2005).
 95. Isaacs A., Lindenmann J. **Virus interference. I. The interferon.** *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **147**, 258-267 (1957).
 96. Ivashkiv L.B., Donlin L.T. **Regulation of type I interferon responses.** *Nature reviews. Immunology* **14**, 36-49 (2014).
 97. Jin H.T., Anderson A.C., Tan W.G., West E.E., Ha S.J., Araki K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., Ahmed R. **Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14733-14738 (2010).
 98. Jin X., Bauer D.E., Tuttleton S.E., Lewin S., Gettie A., Blanchard J., Irwin C.E., Safrit J.T., Mittler J., Weinberger L., Kostrikis L.G., Zhang L., Perelson A.S., Ho D.D. **Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques.** *J Exp Med* **189**, 991-998 (1999).
 99. Kaech S.M., Tan J.T., Wherry E.J., Konieczny B.T., Surh C.D., Ahmed R. **Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells.** *Nat Immunol* **4**, 1191-1198 (2003).
 100. Kagi D., Ledermann B., Burki K., Seiler P., Odermatt B., Olsen K.J., Podack E.R., Zinkernagel R.M., Hengartner H. **Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice.** *Nature* **369**, 31-37 (1994).
 101. Kagi D., Ledermann B., Burki K., Zinkernagel R.M., Hengartner H. **Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo.** *Annu Rev Immunol* **14**, 207-232 (1996).
 102. Kamal S.M., Fehr J., Roesler B., Peters T., Rasenack J.W. **Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C.** *Gastroenterology* **123**, 1070-1083 (2002).
 103. Kamal S.M., Ismail A., Graham C.S., He Q., Rasenack J.W., Peters T., Tawil A.A., Fehr J.J., Khalifa Kel S., Madwar M.M., Koziel M.J. **Pegylated interferon alpha therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetics.** *Hepatology* **39**, 1721-1731 (2004).
 104. Kamimura D., Bevan M.J. **Naive CD8⁺ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo.** *J Exp Med* **204**, 1803-1812 (2007).
 105. Kared H., Saeed S., Klein M.B., Shoukry N.H. **CD127 expression, exhaustion status and antigen specific proliferation predict sustained virologic response to IFN in HCV/HIV co-infected individuals.** *PLoS One* **9**, e101441 (2014).
 106. Karpel M.E., Boutwell C.L., Allen T.M. **BLT humanized mice as a small animal model of HIV infection.** *Curr Opin Virol* **13**, 75-80 (2015).
 107. Karre K., Ljunggren H.G., Piontek G., Kiessling R. **Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy.** *1986. J Immunol* **174**, 6566-6569 (2005).

108. Katabira E.T., Sewankambo N.K., Mugerwa R.D., Belsey E.M., Mubiru F.X., Othieno C., Kataaha P., Karam M., Youle M., Perriens J.H., Lange J.M. **Lack of efficacy of low dose oral interferon alfa in symptomatic HIV-1 infection: a randomised, double blind, placebo controlled trial.** *Sex Transm Infect* **74**, 265-270 (1998).
109. Keppler S.J., Rosenits K., Koegl T., Vucikuja S., Aichele P. **Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses.** *PLoS One* **7**, e40865 (2012).
110. Kindt T.J., Goldsby R.A., Osborne B.A., Kuby J. **Kuby immunology.** (2007).
111. Klenerman P., Cerundolo V., Dunbar P.R. **Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools.** *Nat Rev Immunol* **2**, 263-272 (2002).
112. Kolumam G.A., Thomas S., Thompson L.J., Sprent J., Murali-Krishna K. **Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection.** *J Exp Med* **202**, 637-650 (2005).
113. Konduri V., Decker W.K., Halpert M.M., Gilbert B., Safdar A. **Modeling dendritic cell vaccination for influenza prophylaxis: potential applications for niche populations.** *J Infect Dis* **207**, 1764-1772 (2013).
114. Kumar H., Kawai T., Akira S. **Pathogen recognition by the innate immune system.** *Int Rev Immunol* **30**, 16-34 (2011).
115. Lander M.R., Chattopadhyay S.K. **A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses.** *J Virol* **52**, 695-698 (1984).
116. Lanzavecchia A., Sallusto F. **Regulation of T cell immunity by dendritic cells.** *Cell* **106**, 263-266 (2001).
117. Lapenta C., Santini S.M., Logozzi M., Spada M., Andreotti M., Di Pucchio T., Parlato S., Belardelli F. **Potent immune response against HIV-1 and protection from virus challenge in hu-PBL-SCID mice immunized with inactivated virus-pulsed dendritic cells generated in the presence of IFN- α .** *J Exp Med* **198**, 361-367 (2003).
118. Larrubia J.R., Lokhande M.U., Moreno-Cubero E., Garcia-Garzon S., Miquel J., Parra-Cid T., Gonzalez-Praetorius A., Perna C., Lazaro A., Sanz-de-Villalobos E. **HCV-specific CD8 $^{+}$ cell detection at week 12 of chronic hepatitis C treatment with PEG-interferon-alpha2b/ribavirin correlates with infection resolution.** *Cell Immunol* **286**, 31-38 (2013).
119. Lavender K.J., Gibbert K., Peterson K.E., Van Dis E., Francois S., Woods T., Messer R.J., Gawanbacht A., Muller J.A., Munch J., Phillips K., Race B., Harper M.S., Guo K., Lee E.J., Trilling M., Hengel H., Piehler J., Verheyen J., Wilson C.C., Santiago M.L., Hasenkrug K.J., Dittmer U. **Interferon Alpha Subtype-Specific Suppression of HIV-1 Infection In Vivo.** *J Virol* **90**, 6001-6013 (2016).
120. Lavender K.J., Pang W.W., Messer R.J., Duley A.K., Race B., Phillips K., Scott D., Peterson K.E., Chan C.K., Dittmer U., Dudek T., Allen T.M., Weissman I.L., Hasenkrug K.J. **BLT-humanized C57BL/6 Rag2 $^{-/-}$ gammac $^{-/-}$ CD47 $^{-/-}$ mice are resistant to GVHD and develop B and T cell immunity to HIV infection.** *Blood* (2013).

121. Lavoie T.B., Kalie E., Crisafulli-Cabatu S., Abramovich R., DiGioia G., Moolchan K., Pestka S., Schreiber G. **Binding and activity of all human alpha interferon subtypes.** *Cytokine* **56**, 282-289 (2011).
122. Le Bon A., Thompson C., Kamphuis E., Durand V., Rossmann C., Kalinke U., Tough D.F. **Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN.** *Journal of immunology* **176**, 2074-2078 (2006).
123. Le Bon A., Tough D.F. **Type I interferon as a stimulus for cross-priming.** *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 33-40 (2008).
124. Lehmann C., Taubert D., Jung N., Fatkenheuer G., van Lunzen J., Hartmann P., Romero F. **Preferential upregulation of interferon-alpha subtype 2 expression in HIV-1 patients.** *AIDS Res Hum Retroviruses* **25**, 577-581 (2009).
125. Lekmine F., Sassano A., Uddin S., Majchrzak B., Miura O., Druker B.J., Fish E.N., Imamoto A., Plataniias L.C. **The CrkL adapter protein is required for type I interferon-dependent gene transcription and activation of the small G-protein Rap1.** *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 744-750 (2002).
126. Letvin N.L., Eaton K.A., Aldrich W.R., Sehgal P.K., Blake B.J., Schlossman S.F., King N.W., Hunt R.D. **Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2718-2722 (1983).
127. Li B.L., Zhao X.X., Liu X.Y., Kim H.S., Raska K., Jr., Ortaldo J.R., Schwartz B., Pestka S. **Alpha-interferon structure and natural killer cell stimulatory activity.** *Cancer research* **50**, 5328-5332 (1990).
128. Li J.P., D'Andrea A.D., Lodish H.F., Baltimore D. **Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor.** *Nature* **343**, 762-764 (1990).
129. Li L., Sherry B. **IFN-alpha expression and antiviral effects are subtype and cell type specific in the cardiac response to viral infection.** *Virology* **396**, 59-68 (2010).
130. Lindahl-Magnusson P., Leary P., Gresser I. **Interferon inhibits DNA synthesis induced in mouse lymphocyte suspensions by phytohaemagglutinin or by allogeneic cells.** *Nat New Biol* **237**, 120-121 (1972).
131. Littwitz-Salomon E., Akhmetzyanova I., Vallet C., Francois S., Dittmer U., Gibbert K. **Activated regulatory T cells suppress effector NK cell responses by an IL-2-mediated mechanism during an acute retroviral infection.** *Retrovirology* **12**, 66 (2015).
132. Littwitz E., Francois S., Dittmer U., Gibbert K. **Distinct roles of NK cells in viral immunity during different phases of acute Friend retrovirus infection.** *Retrovirology* **10**, 127 (2013).
133. Lloyd R.E., Blalock J.E., Stanton G.J. **Cell-to-cell transfer of interferon-induced antiproliferative activity.** *Science* **221**, 953-955 (1983).
134. Luft T., Pang K.C., Thomas E., Hertzog P., Hart D.N., Trapani J., Cebon J. **Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells.** *J Immunol* **161**, 1947-1953 (1998).
135. Macatonia S.E., Hosken N.A., Litton M., Vieira P., Hsieh C.S., Culpepper J.A., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K.M., O'Garra A. **Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells.** *J Immunol* **154**, 5071-5079 (1995).

136. Maddur M.S., Vani J., Lacroix-Desmazes S., Kaveri S.V., Bayry J. **Contribution of myeloid dendritic cells to type I interferon-induced cytokines and chemokines: comment on the article by Bilgic et al.** *Arthritis Rheum* **62**, 2181-2182; author reply 2182 (2010).
137. Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A.H., Jonuleit H. **Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells.** *Immunol Cell Biol* **80**, 477-483 (2002).
138. Malyskhina A., Littwitz-Salomon E., Sutter K., Zelinskyy G., Windmann S., Schimmer S., Paschen A., Streeck H., Hasenkrug K.J., Dittmer U. **Fas Ligand-mediated cytotoxicity of CD4+ T cells during chronic retrovirus infection.** *Sci Rep* **7**, 7785 (2017).
139. Manion M., Rodriguez B., Medvik K., Hardy G., Harding C.V., Schooley R.T., Pollard R., Asmuth D., Murphy R., Barker E., Brady K.E., Landay A., Funderburg N., Sieg S.F., Lederman M.M. **Interferon-alpha administration enhances CD8+ T cell activation in HIV infection.** *PLoS One* **7**, e30306 (2012).
140. Mantegazza A.R., Magalhaes J.G., Amigorena S., Marks M.S. **Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II.** *Traffic* **14**, 135-152 (2013).
141. Marie I., Durbin J.E., Levy D.E. **Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7.** *The EMBO journal* **17**, 6660-6669 (1998).
142. Marrack P., Kappler J., Mitchell T. **Type I interferons keep activated T cells alive.** *Journal of Experimental Medicine* **189**, 521-529 (1999).
143. Masumi A. **Hematopoietic Stem Cells and Response to Interferon.** (2013).
144. Mattei F., Schiavoni G., Belardelli F., Tough D.F. **IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation.** *J Immunol* **167**, 1179-1187 (2001).
145. Micco L., Peppia D., Loggi E., Schurich A., Jefferson L., Cursaro C., Panno A.M., Bernardi M., Brander C., Bihl F., Andreone P., Maini M.K. **Differential boosting of innate and adaptive antiviral responses during pegylated-interferon-alpha therapy of chronic hepatitis B.** *J Hepatol* **58**, 225-233 (2013).
146. Mills K.H. **Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?** *Nat Rev Immunol* **4**, 841-855 (2004).
147. Moll H.P., Maier T., Zommer A., Lavoie T., Brostjan C. **The differential activity of interferon-alpha subtypes is consistent among distinct target genes and cell types.** *Cytokine* **53**, 52-59 (2011).
148. Montoya M., Schiavoni G., Mattei F., Gresser I., Belardelli F., Borrow P., Tough D.F. **Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation.** *Blood* **99**, 3263-3271 (2002).
149. Moore T.C., Gonzaga L.M., Mather J.M., Messer R.J., Hasenkrug K.J. **B Cell Requirement for Robust Regulatory T Cell Responses to Friend Retrovirus Infection.** *MBio* **8** (2017).
150. Morgan D.J., Liblau R., Scott B., Fleck S., McDevitt H.O., Sarvetnick N., Lo D., Sherman L.A. **CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice.** *J Immunol* **157**, 978-983 (1996).

-
151. Mosmann T.R., Coffman R.L. **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** *Annu Rev Immunol* **7**, 145-173 (1989).
 152. Murtaugh M.P., Foss D.L. **Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation.** *Vet Immunol Immunopathol* **87**, 109-121 (2002).
 153. Myers R.P., Regimbeau C., Thevenot T., Leroy V., Mathurin P., Opolon P., Zarski J.P., Poynard T. **Interferon for interferon naive patients with chronic hepatitis C.** *Cochrane Database Syst Rev*, CD000370 (2002).
 154. Neil S.J., Zang T., Bieniasz P.D. **Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu.** *Nature* **451**, 425-430 (2008).
 155. Nelson D.R., Marousis C.G., Ohno T., Davis G.L., Lau J.Y. **Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C.** *Hepatology* **28**, 225-230 (1998).
 156. Neumann A.U., Lam N.P., Dahari H., Gretch D.R., Wiley T.E., Layden T.J., Perelson A.S. **Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy.** *Science* **282**, 103-107 (1998).
 157. Ng C.T., Sullivan B.M., Teijaro J.R., Lee A.M., Welch M., Rice S., Sheehan K.C., Schreiber R.D., Oldstone M.B. **Blockade of interferon Beta, but not interferon alpha, signaling controls persistent viral infection.** *Cell Host Microbe* **17**, 653-661 (2015).
 158. Nguyen K.B., Watford W.T., Salomon R., Hofmann S.R., Pien G.C., Morinobu A., Gadina M., O'Shea J.J., Biron C.A. **Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection.** *Science* **297**, 2063-2066 (2002).
 159. NIH. **Diagram of the HIV virus.** (2005) [zitiert am 26.11.2017] Verfügbar auf: https://en.wikipedia.org/wiki/File:HIV_Virion-en-2.png
 160. Nisole S., Saib A. **Early steps of retrovirus replicative cycle.** *Retrovirology* **1**, 9 (2004).
 161. Novembre F.J., de Rosayro J., Nidtha S., O'Neil S.P., Gibson T.R., Evans-Strickfaden T., Hart C.E., McClure H.M. **Rapid CD4(+) T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees.** *J Virol* **75**, 1533-1539 (2001).
 162. O'Neil S.P., Novembre F.J., Hill A.B., Suwyn C., Hart C.E., Evans-Strickfaden T., Anderson D.C., deRosayro J., Herndon J.G., Saucier M., McClure H.M. **Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees.** *J Infect Dis* **182**, 1051-1062 (2000).
 163. Odorizzi P.M., Wherry E.J. **Inhibitory receptors on lymphocytes: insights from infections.** *J Immunol* **188**, 2957-2965 (2012).
 164. Oldstone M.B. **A Jekyll and Hyde Profile: Type 1 Interferon Signaling Plays a Prominent Role in the Initiation and Maintenance of a Persistent Virus Infection.** *J Infect Dis* **212 Suppl 1**, S31-36 (2015).
 165. Padovan E., Spagnoli G.C., Ferrantini M., Heberer M. **IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells.** *J Leukoc Biol* **71**, 669-676 (2002).
 166. Paliard X., de Waal Malefijt R., Yssel H., Blanchard D., Chretien I., Abrams J., de Vries J., Spits H. **Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones.** *J Immunol* **141**, 849-855 (1988).

167. Pantaleo G., Soudeyns H., Demarest J.F., Vaccarezza M., Graziosi C., Paolucci S., Daucher M., Cohen O.J., Denis F., Biddison W.E., Sekaly R.P., Fauci A.S. **Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9848-9853 (1997).
168. Paquette R.L., Hsu N.C., Kiertcher S.M., Park A.N., Tran L., Roth M.D., Glaspy J.A. **Interferon-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells.** *J Leukoc Biol* **64**, 358-367 (1998).
169. Parish C.R. **Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies.** *Immunol Cell Biol* **77**, 499-508 (1999).
170. Parlato S., Santini S.M., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada M., Giammarioli A.M., Malorni W., Fais S., Belardelli F. **Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities.** *Blood* **98**, 3022-3029 (2001).
171. Pasare C., Medzhitov R. **Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells.** *Science* **299**, 1033-1036 (2003).
172. Paul F., Pellegrini S., Uze G. **IFNA2: The prototypic human alpha interferon.** *Gene* **567**, 132-137 (2015).
173. Pearce E.L., Mullen A.C., Martins G.A., Krawczyk C.M., Hutchins A.S., Zediak V.P., Banica M., DiCioccio C.B., Gross D.A., Mao C.A., Shen H., Cereb N., Yang S.Y., Lindsten T., Rossant J., Hunter C.A., Reiner S.L. **Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin.** *Science* **302**, 1041-1043 (2003).
174. Pedreira C.E., Costa E.S., Lecrevisse Q., van Dongen J.J., Orfao A., EuroFlow C. **Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges.** *Trends Biotechnol* **31**, 415-425 (2013).
175. Penna A., Laccabue D., Libri I., Giuberti T., Schivazappa S., Alfieri A., Mori C., Canetti D., Lampertico P., Vigano M., Colombo M., Loggi E., Missale G., Ferrari C. **Peginterferon-alpha does not improve early peripheral blood HBV-specific T-cell responses in HBeAg-negative chronic hepatitis.** *J Hepatol* **56**, 1239-1246 (2012).
176. Perrillo R. **Benefits and risks of interferon therapy for hepatitis B.** *Hepatology* **49**, S103-111 (2009).
177. Pestka S. **The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn.** *J Biol Chem* **282**, 20047-20051 (2007).
178. Pestka S., Krause C.D., Walter M.R. **Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors.** *Immunol Rev* **202**, 8-32 (2004).
179. Petricoin E.F., 3rd, Ito S., Williams B.L., Audet S., Stancato L.F., Gamero A., Clouse K., Grimley P., Weiss A., Beeler J., Finbloom D.S., Shores E.W., Abraham R., Larner A.C. **Antiproliferative action of interferon-alpha requires components of T-cell-receptor signalling.** *Nature* **390**, 629-632 (1997).
180. Pham C.T., Ley T.J. **The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity.** *Semin Immunol* **9**, 127-133 (1997).
181. Pipkin M.E., Sacks J.A., Cruz-Guilloty F., Lichtenheld M.G., Bevan M.J., Rao A. **Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional**

- programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* **32**, 79-90 (2010).
182. Platanias L.C. **Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling.** *Nat Rev Immunol* **5**, 375-386 (2005).
183. Rahman F., Heller T., Sobao Y., Mizukoshi E., Nascimbeni M., Alter H., Herrine S., Hoofnagle J., Liang T.J., Rehermann B. **Effects of antiviral therapy on the cellular immune response in acute hepatitis C.** *Hepatology* **40**, 87-97 (2004).
184. Randall R.E., Goodbourn S. **Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures.** *The Journal of general virology* **89**, 1-47 (2008).
185. Reid S.D., Penna G., Adorini L. **The control of T cell responses by dendritic cell subsets.** *Curr Opin Immunol* **12**, 114-121 (2000).
186. Robertson M.N., Spangrude G.J., Hasenkrug K., Perry L., Nishio J., Wehrly K., Chesebro B. **Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice.** *J Virol* **66**, 3271-3277 (1992).
187. Rodriguez-Manzanet R., DeKruyff R., Kuchroo V.K., Umetsu D.T. **The costimulatory role of TIM molecules.** *Immunol Rev* **229**, 259-270 (2009).
188. Rong L., Perelson A.S. **Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling.** *Crit Rev Immunol* **30**, 131-148 (2010).
189. Roos G., Leanderson T., Lundgren E. **Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells.** *Cancer Res* **44**, 2358-2362 (1984).
190. Rotzschke O., Falk K., Stevanovic S., Jung G., Walden P., Rammensee H.G. **Exact prediction of a natural T cell epitope.** *Eur J Immunol* **21**, 2891-2894 (1991).
191. Rouzaut A., Garasa S., Teijeira A., Gonzalez I., Martinez-Forero I., Suarez N., Larrea E., Alfaro C., Palazon A., Dubrot J., Hervas-Stubbs S., Melero I. **Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN-alpha.** *Eur J Immunol* **40**, 3054-3063 (2010).
192. Rustagi A., Gale M., Jr. **Innate antiviral immune signaling, viral evasion and modulation by HIV-1.** *J Mol Biol* **426**, 1161-1177 (2014).
193. Santini S.M., Di Pucchio T., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. **The natural alliance between type I interferon and dendritic cells and its role in linking innate and adaptive immunity.** *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **22**, 1071-1080 (2002).
194. Sarkar S., Kalia V., Haining W.N., Konieczny B.T., Subramaniam S., Ahmed R. **Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates.** *J Exp Med* **205**, 625-640 (2008).
195. Sarma J.V., Ward P.A. **The complement system.** *Cell Tissue Res* **343**, 227-235 (2011).
196. Sauter D., Kirchhoff F. **HIV replication: a game of hide and sense.** *Curr Opin HIV AIDS* **11**, 173-181 (2016).
197. Schmidt C.S., Mescher M.F. **Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12.** *J Immunol* **168**, 5521-5529 (2002).

198. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. **Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.** *J Leukoc Biol* **75**, 163-189 (2004).
199. Sedger L.M., McDermott M.F. **TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future.** *Cytokine Growth Factor Rev* **25**, 453-472 (2014).
200. Shein H.M., Enders J.F. **Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 1164-1172 (1962).
201. Shresta S., Pham C.T., Thomas D.A., Graubert T.A., Ley T.J. **How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?** *Curr Opin Immunol* **10**, 581-587 (1998).
202. Shultz L.D., Ishikawa F., Greiner D.L. **Humanized mice in translational biomedical research.** *Nat Rev Immunol* **7**, 118-130 (2007).
203. Siegal F.P., Kadowaki N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly P.A., Shah K., Ho S., Antonenko S., Liu Y.J. **The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood.** *Science* **284**, 1835-1837 (1999).
204. Silverman R.H. **Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response.** *Journal of virology* **81**, 12720-12729 (2007).
205. Simmons D.P., Wearsch P.A., Canaday D.H., Meyerson H.J., Liu Y.C., Wang Y., Boom W.H., Harding C.V. **Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing.** *J Immunol* **188**, 3116-3126 (2012).
206. Sleijfer S., Bannink M., Van Gool A.R., Kruit W.H., Stoter G. **Side effects of interferon-alpha therapy.** *Pharm World Sci* **27**, 423-431 (2005).
207. Smyth M.J., Cretney E., Kelly J.M., Westwood J.A., Street S.E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S.L., Degli-Esposti M.A., Hayakawa Y. **Activation of NK cell cytotoxicity.** *Mol Immunol* **42**, 501-510 (2005).
208. Song J., Li S., Zhou Y., Liu J., Francois S., Lu M., Yang D., Dittmer U., Sutter K. **Different antiviral effects of IFNalpha subtypes in a mouse model of HBV infection.** *Sci Rep* **7**, 334 (2017).
209. Spangenberg H.C., Viazov S., Kersting N., Neumann-Haefelin C., McKinney D., Roggendorf M., von Weizsacker F., Blum H.E., Thimme R. **Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection.** *Hepatology* **42**, 828-837 (2005).
210. Sprinzl M.F., Russo C., Kittner J., Allgayer S., Grambihler A., Bartsch B., Weinmann A., Galle P.R., Schuchmann M., Protzer U., Bauer T. **Hepatitis B virus-specific T-cell responses during IFN administration in a small cohort of chronic hepatitis B patients under nucleos(t)ide analogue treatment.** *J Viral Hepat* **21**, 633-641 (2014).
211. Steinman R.M. **The dendritic cell system and its role in immunogenicity.** *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296 (1991).
212. Sun J., Bird C.H., Sutton V., McDonald L., Coughlin P.B., De Jong T.A., Trapani J.A., Bird P.I. **A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes.** *J Biol Chem* **271**, 27802-27809 (1996).
213. Takeuchi O., Akira S. **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell* **140**, 805-820 (2010).

-
214. Tanabe Y., Nishibori T., Su L., Arduini R.M., Baker D.P., David M. **Cutting edge: role of STAT1, STAT3, and STAT5 in IFN-alpha beta responses in T lymphocytes.** *J Immunol* **174**, 609-613 (2005).
215. Teijaro J.R., Ng C., Lee A.M., Sullivan B.M., Sheehan K.C., Welch M., Schreiber R.D., de la Torre J.C., Oldstone M.B. **Persistent LCMV infection is controlled by blockade of type I interferon signaling.** *Science* **340**, 207-211 (2013).
216. Terawaki S., Chikuma S., Shibayama S., Hayashi T., Yoshida T., Okazaki T., Honjo T. **IFN-alpha directly promotes programmed cell death-1 transcription and limits the duration of T cell-mediated immunity.** *J Immunol* **186**, 2772-2779 (2011).
217. Tovey M.G., Lallemand C., Meritet J.F., Maury C. **Adjuvant activity of interferon alpha: mechanism(s) of action.** *Vaccine* **24 Suppl 2**, S2-46-47 (2006).
218. Urban S.L., Welsh R.M. **Out-of-sequence signal 3 as a mechanism for virus-induced immune suppression of CD8 T cell responses.** *PLoS Pathog* **10**, e1004357 (2014).
219. van Boxel-Dezaire A.H., Rani M.R., Stark G.R. **Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons.** *Immunity* **25**, 361-372 (2006).
220. Van Heuverswyn F., Li Y., Neel C., Bailes E., Keele B.F., Liu W., Loul S., Butel C., Liegeois F., Bienvenue Y., Ngolle E.M., Sharp P.M., Shaw G.M., Delaporte E., Hahn B.H., Peeters M. **Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas.** *Nature* **444**, 164 (2006).
221. Van Parijs L., Abbas A.K. **Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses.** *Curr Opin Immunol* **8**, 355-361 (1996).
222. Vanderford T.H., Slichter C., Rogers K.A., Lawson B.O., Obaede R., Else J., Villinger F., Bosinger S.E., Silvestri G. **Treatment of SIV-infected sooty mangabeys with a type-I IFN agonist results in decreased virus replication without inducing hyperimmune activation.** *Blood* **119**, 5750-5757 (2012).
223. Veiga-Parga T., Sehrawat S., Rouse B.T. **Role of regulatory T cells during virus infection.** *Immunol Rev* **255**, 182-196 (2013).
224. Veugelers K., Motyka B., Goping I.S., Shostak I., Sawchuk T., Bleackley R.C. **Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate.** *Mol Biol Cell* **17**, 623-633 (2006).
225. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. **How regulatory T cells work.** *Nat Rev Immunol* **8**, 523-532 (2008).
226. Wang B.X., Fish E.N. **The yin and yang of viruses and interferons.** *Trends Immunol* **33**, 190-197 (2012).
227. Warrington R., Watson W., Kim H.L., Antonetti F.R. **An introduction to immunology and immunopathology.** *Allergy Asthma Clin Immunol* **7 Suppl 1**, S1 (2011).
228. Wherry E.J., Ahmed R. **Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection.** *J Virol* **78**, 5535-5545 (2004).
229. Wherry E.J., Teichgraber V., Becker T.C., Masopust D., Kaech S.M., Antia R., von Andrian U.H., Ahmed R. **Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets.** *Nat Immunol* **4**, 225-234 (2003).

-
230. Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A., et al. **Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.** *Immunity* **3**, 673-682 (1995).
231. Williams B.R. **Signal integration via PKR.** *Sci STKE* **2001**, re2 (2001).
232. Wilson E.B., Yamada D.H., Elsaesser H., Herskovitz J., Deng J., Cheng G., Aronow B.J., Karp C.L., Brooks D.G. **Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection.** *Science* **340**, 202-207 (2013).
233. Woelk C.H., Frost S.D., Richman D.D., Higley P.E., Kosakovsky Pond S.L. **Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals.** *Gene* **397**, 38-50 (2007).
234. Xu L., Yang L., Liu W. **Distinct evolution process among type I interferon in mammals.** *Protein Cell* **4**, 383-392 (2013).
235. Yamamoto S., Yano H., Sanou O., Ikegami H., Kurimoto M., Kojiro M. **Different antiviral activities of IFN-alpha subtypes in human liver cell lines: synergism between IFN-alpha2 and IFN-alpha8.** *Hepatol Res* **24**, 99 (2002).
236. Yano H., Yanai Y., Momosaki S., Ogasawara S., Akiba J., Kojiro S., Moriya F., Fukahori S., Kurimoto M., Kojiro M. **Growth inhibitory effects of interferon-alpha subtypes vary according to human liver cancer cell lines.** *J Gastroenterol Hepatol* **21**, 1720-1725 (2006).
237. Yasuda K., Richez C., Maciaszek J.W., Agrawal N., Akira S., Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R. **Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production.** *J Immunol* **178**, 6876-6885 (2007).
238. Yeow W.S., Lawson C.M., Beilharz M.W. **Antiviral activities of individual murine IFN-alpha subtypes in vivo: intramuscular injection of IFN expression constructs reduces cytomegalovirus replication.** *J Immunol* **160**, 2932-2939 (1998).
239. Yoshida A., Tanaka R., Murakami T., Takahashi Y., Koyanagi Y., Nakamura M., Ito M., Yamamoto N., Tanaka Y. **Induction of protective immune responses against R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intrasplenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4(+) T-cell origin.** *J Virol* **77**, 8719-8728 (2003).
240. Zelinskyy G., Balkow S., Schimmer S., Schepers K., Simon M.M., Dittmer U. **Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection.** *Virology* **330**, 365-374 (2004).
241. Zelinskyy G., Kraft A.R., Schimmer S., Arndt T., Dittmer U. **Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection.** *Eur J Immunol* **36**, 2658-2670 (2006).
242. Zelinskyy G., Myers L., Dietze K.K., Gibbert K., Roggendorf M., Liu J., Lu M., Kraft A.R., Teichgraber V., Hasenkrug K.J., Dittmer U. **Virus-specific CD8+ T cells upregulate programmed death-1 expression during acute friend retrovirus infection but are highly cytotoxic and control virus replication.** *Journal of immunology* **187**, 3730-3737 (2011).

-
243. Zelinskyy G., Robertson S.J., Schimmer S., Messer R.J., Hasenkrug K.J., Dittmer U. **CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection.** *J Virol* **79**, 10619-10626 (2005).
244. Zhen A., Rezek V., Youn C., Lam B., Chang N., Rick J., Carrillo M., Martin H., Kasparian S., Syed P., Rice N., Brooks D.G., Kitchen S.G. **Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection.** *J Clin Invest* **127**, 260-268 (2017).
245. Zhou P., Tachedjian M., Wynne J.W., Boyd V., Cui J., Smith I., Cowled C., Ng J.H., Mok L., Michalski W.P., Mendenhall I.H., Tachedjian G., Wang L.F., Baker M.L. **Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN-alpha in bats.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 2696-2701 (2016).
246. Zwarthoff E.C., Mooren A.T., Trapman J. **Organization, structure and expression of murine interferon alpha genes.** *Nucleic Acids Res* **13**, 791-804 (1985).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
A	
AEC	3-Amino 4-Ethylencarbazol
AF	Alexa Fluor
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (engl. <i>Acquired immuno-deficiency syndrom</i>)
Antikörper	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APOBEC3G	engl. <i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3G</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ART	engl. <i>Antiretroviral Therapy</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B	
BFA	Brefeldin A
BLT	Knochenmark-Leber-Thymus (engl. <i>Bone marrow-Liver-Thymus</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	
°C	Grad Celsius
Ca.	circa
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (engl. <i>Cluster of differentiation</i>)
cDNA	Komplementäre DNA (engl. <i>Complementary DNA</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
cGAS	engl. <i>Cyclic GMP-AMP cGAMP synthase</i>

CMV	Zytomegalievirus
CRKL	engl. <i>V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i>
CSF	Kolonie-stimulierende Faktor
CST	Cell Signaling Technology
CTLA-4	Zytotoxisches T Lymphozyten Antigen 4 (engl. <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>)
CXCL	Chemokinrezeptor-Ligand
D	
DC	Dendritische Zelle
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	engl. <i>Death cell receptor</i>
E	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>Enhanced green fluorescent protein</i>)
eIF2 α	eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 α
ELISA	engl. <i>enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
<i>env</i>	Retrovirus-spezifisches Gen für Glykoproteine (engl. <i>Envelope</i>)
Eomes	Eomesodermin
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierende Kinasen
F	
FACS	(<i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
FasL	Fas Ligand
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FFU	engl. <i>Focus forming units</i>
FIV	Felines Immundefizienzvirus (engl. <i>Feline immunodeficiency virus</i>)
F-MuLV	Murine Friend Leukämievirus (engl. <i>Friend murine leukemia virus</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>Forward scatter</i>)
FV	Friend Retrovirus
FVD	Lebend-Tot-Farbstoff (engl. <i>Fixable viability dye</i>)

G

g	Gravitation, Erdbeschleunigung
g	Gramm
<i>gag</i>	Retrovirus-spezifisches Gen für gruppenspezifisches Antigene
GAS	engl. <i>IFNγ-activated sites</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GzmB	Granzym B

H

h	Stunde
HA	Hämagglutinin Peptid des Influenzavirus A
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Hhumanes Immundefizienzvirus
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen DR
HRP	Meerrettichperoxidase
HTLV-1	Humanes T-lymphotropes Virus 1

I

IC	engl. <i>Infectious center</i>
IFN	Interferon
IFNAR	IFN α/β -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
I κ B α	engl. <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IP-10	IFN-induzierten Proteins-10
IRF	engl. <i>Interferon regulatory factor</i>
IRS1	engl. <i>Insulin receptor substrate 1</i>
ISG	IFN stimuliertes Gen
ISGF3	engl. <i>Interferon stimulated gene factor 3</i>
ISRE	engl. <i>IFN-stimulated response element</i>
i.v.	intravenös

J

JAK1 Januskinase 1

JAK/STAT engl. *Janus activated kinase–signal transducer and activation of transcription*

L

L Liter

LCMV Lymphozytäre Choriomeningitis Virus

M

μ mikro

m milli

M Molar

MACS engl. *Magnetic Cell Sorting*

MAPK engl. *mitogen-activated protein kinase*

MDA-5 engl. *melanoma differentiation-associated gene 5*

MFI Mittlere Fluoreszenzität

MHC Haupthistokompatibilitätskomplex

min Minute

MOI engl. *Multiplicity of infection*

mRNA engl. *Messenger RNA*

mTOR engl. *Mammalian target of rapamycin*

MuLV Murines Leukämievirus

Mx Myxovirus Resistenzproteine

N

n nano

NF-κB engl. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*

NK Zellen Natürliche Killerzellen

NLR NOD-ähnliche Rezeptoren

NOD engl. *nucleotide binding oligomerization domain*

O

OAS 2,5-Oligoadenlyatsynthetase

Ova Ovalbumin Peptid

OVCAR-3 Humane Ovarialzelllinie

P

PAMPs	Pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBMCs	Periphere mononukleären Blutzellen (engl. <i>peripheral Blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PD-1	Protein 1 für den programmierten Zelltod (engl. <i>Programmed cell death-1</i>)
PD-L1	PD-1 Ligand
PE	Phycoerythrin
Per-CP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex
pH	negative dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration (lat. <i>potentia Hydrogenii</i>)
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>pol</i>	Retrovirus-spezifisches Gen für die Polymerase
Poly (I:C)	Poly-Inosin-:Poly-Cytidyl-Säure
PRR	Mustererkennende Rezeptoren (engl. <i>pattern recognition receptors</i>)

R

RIG I	engl. <i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RNase L	RNA Nuklease L
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)

S

SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SFFU	engl. <i>spleen focus forming units</i>
SFFV	engl. <i>Spleen Focus Forming Virus</i>
SH ₂	engl. <i>src-homolgy 2</i>

SIV	Simianes Immundefizienzvirus (engl. <i>Simian immunodeficiency virus</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>sideward scatter</i>)
STAT	engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	
TBS	Engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS Puffer mit Tween-20
TCR	T Zellrezeptor
TCRtg	Transgener T Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tet	Tetramer
T _f H	Follikuläre Helfer T Zellen
T _H	T Helferzelle
Tim-3	T Zell Immunglobulin Mucin 3 (engl. <i>T cell immunoglobulin mucin 3</i>)
TLR	Tollähnlichen Rezeptoren (engl. <i>toll like receptor</i>)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF α Rezeptor
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender (engl. <i>Ligand TNF related-apoptosis-inducing ligand</i>)
TRIM5 α	engl. <i>tripartite motif 5</i>
TYK2	Tyrosinkinase 2
V	
VSV	Vaskuläre Stomatitisvirus
VT	Cell Trace™ violet
W	
WISH	Humane Embryonalzelllinie
WT	Wildtyp
Y	
Y	Tyrosin

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Die Dynamik einer CD8 ⁺ T Zellantwort während einer viralen Infektion.	9
Abb. 1-2 Der klassische JAK/STAT-Signalweg [143]	12
Abb. 1-3 Typ I IFN-induzierte Signalwege - der klassische JAK/STAT-Signalweg und alternative Signalwege.	14
Abb. 1-4 Immunmodulatorische Funktionen von Typ I IFN auf Immunzellen.	17
Abb. 1-5 Virale Evasionsstrategien der Typ I IFN Antwort.	18
Abb. 1-6 Schematischer Aufbau von Retroviren.	22
Abb. 1-7 Replikationszyklus von Retroviren.	24
Abb. 2-1 Schematische Darstellung des verwendeten Plasmids [238] und der enthaltenden Sequenzen der IFN α -Subtypen-Gen [31].	42
Abb. 3-1 Prinzip <i>in vitro</i> Proliferationstest.	51
Abb. 3-2 Prinzip <i>in vitro</i> Zytotoxizitätstest.	51
Abb. 3-3 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (Verändert nach [174])	57
Abb. 3-4 Der Aufbau eines MHC I-Tetramers.	60
Abb. 4-1 Analyse der CD8 ⁺ T Zell Proliferation nach Stimulation mit IFN α Subtypen.	70
Abb. 4-2 Schematische Darstellung für die durchflusszytometrische Analyse der CD8 ⁺ T Zellen hinsichtlich der intrazellulären Expression von Zytokinen sowie GzmB nach IFN α Subtyp Stimulation.	72
Abb. 4-3 Analyse der intrazellulären GzmB Produktion in CD8 ⁺ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation.	73
Abb. 4-4 Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion bezüglich der Expression von IFN γ , IL-2 und TNF α in IFN α Subtyp-behandelten CD8 ⁺ T Zellen.	75
Abb. 4-5 Korrelation des antiproliferativen Effekts und der Induktion von IL-2- und TNF α -produzierender CD8 ⁺ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation.	76
Abb. 4-6 Proliferation und Expression von GzmB, IFN γ , IL-2 und TNF α in Abhängigkeit der IFN α Konzentration.	78
Abb. 4-7 Kinetik der Proliferation und Expression von GzmB, IFN γ , IL-2 und TNF α in CD8 ⁺ T Zellen nach IFN α Subtyp Behandlung.	80
Abb. 4-8 Analyse der Zytotoxizität von IFN α -stimulierten CD8 ⁺ T Zellen.	81
Abb. 4-9 Untersuchung der Proliferation und intrazellulären Zytokinproduktion in IFN α Subtyp-stimulierten Influenza-spezifischen CD8 ⁺ T Zellen.	84

Abb. 4-10 Untersuchung der Proliferation und intrazellulären Zytokinproduktion in IFN α Subtyp-stimulierten OT I CD8 $^{+}$ T Zellen.....	86
Abb. 4-11 Korrelation des antiproliferativen Effekts und der Induktion von TNF α -produzierender CD8 $^{+}$ T Zellen nach IFN α Subtyp Stimulation in verschiedenen Antigen-spezifischen Proliferationstests.....	87
Abb. 4-12 Schematische Darstellung für die durchflusszytometrische Analyse der DCs hinsichtlich der Expression von Aktivierungs- und Maturierungsmerkmalen.....	88
Abb. 4-13 Analyse der Aktivierung und Maturierung von IFN α Subtyp-stimulierten DCs.	90
Abb. 4-14 Untersuchung der Zytokinexpressionslevel in Zellkulturüberständen von CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs.	92
Abb. 4-15 Einfluss der IFNAR Expression auf die Proliferation von CD8 $^{+}$ T Zellen und auf die Produktion von intrazellulären Zytokinen nach Stimulation mit IFN α Subtypen.	96
Abb. 4-16 Einfluss der IFNAR Expression auf die Effektorfunktionen von CD8 $^{+}$ T Zellen im <i>in vitro</i> Zytotoxizitätstest.	97
Abb. 4-17 Einfluss der IFNAR Expression auf die Effektorfunktionen von CD8 $^{+}$ T Zellen im <i>in vivo</i> Zytotoxizitätstest.....	99
Abb. 4-18 Schematische Darstellung der immunmodulatorischen Eigenschaften von IFN α auf CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs.....	101
Abb. 4-19 Einfluss der IFN α Subtyp-Stimulation auf die STAT Phosphorylierung im Proliferationstest.....	103
Abb. 4-20 Analyse des JAK/STAT-Signalweges durch IFN α Subtyp-Stimulation in CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs.....	106
Abb. 4-21 Analyse von alternativen Typ I IFN-induzierten Signalwegen durch IFN α Subtyp-Stimulation in CD8 $^{+}$ T Zellen und DCs	107
Abb. 4-22 Einfluss der IFN α Subtyp Behandlung auf die Viruslast während der akuten FV Infektion.	110
Abb. 4-23 Untersuchung der CD8 $^{+}$ T Zellzahl während der akuten FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.	111
Abb. 4-24 Analyse der Effektorfunktionen von CD8 $^{+}$ T Zellen während der akuten FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.	113

Abb. 4-25 Analyse von regulatorischen CD4 ⁺ T Zellen während der akuten FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.....	115
Abb. 4-26 Schematische Darstellung für die durchflusszytometrische Analyse der eGFP Expression in CD8 ⁺ T Zellen.....	117
Abb. 4-27 Einfluss der IFN α Subtyp Behandlung auf die Aktivierung von Typ I IFN Signalwegen in CD8 ⁺ T Zellen während der akuten FV Infektion.	118
Abb. 4-28 Einfluss der IFN α Subtyp Behandlung auf die Viruslast während der chronischen FV Infektion.....	120
Abb. 4-29 Untersuchung der CD8 ⁺ T Zellantwort während der chronischen FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.....	122
Abb. 4-30 Expression von inhibitorischen Rezeptoren auf CD8 ⁺ T Zellen während der chronischen FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.....	123
Abb. 4-31 Analyse von regulatorischen CD4 ⁺ T Zellen während der chronischen FV Infektion nach IFN α Subtyp Behandlung.	125

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1 Geräte	29
Tab. 2-2 Verwendete Materialien.....	30
Tab. 2-3 Chemikalien	32
Tab. 2-4 Kommerzielle Standardkits.....	33
Tab. 2-5 Puffer und Lösungen	34
Tab. 2-6 Tetramere und Peptide.....	36
Tab. 2-7 Antikörper für Durchflusszytometrie	37
Tab. 2-8 Antikörper für Western Blot	38
Tab. 2-9 Sonstige Antikörper	38
Tab. 2-10 Wildtypmäuse.....	39
Tab. 2-11 Knockout ^(-/-) Mäuse	39
Tab. 2-12 Transgene Mäuse	40
Tab. 2-13 Zelllinien	41
Tab. 2-14 Bakterien	41
Tab. 2-15 IFN α Subtyp Plasmide.....	41
Tab. 2-16 Primer.....	43
Tab. 3-1 RT-PCR Protokoll.....	63
Tab. 3-2 Zusammensetzung SDS-Gele.....	65

8.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Ulf und Kathrin bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben haben, an diesem tollen Projekt zu arbeiten. Vielen Dank für euren kompetenten Rat und die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen. Insbesondere möchte ich mich bei Kathrin bedanken, die tagtäglich einen oder gleich mehrere sehr nützliche Ratschläge parat hatte! Danke für deine tatkräftige Unterstützung und freundschaftlichen Beistand!

Für eine erfolgreiche Promotion braucht man natürlich Verstärkung! Die findet man zum Beispiel im IG-1 (2.OG). Dabei geht mein besonderer Dank an Sandra. Vielen Dank für all die praktischen Tipps und deine aufmunternde Art, du hast meinen Laboralltag in den letzten Jahren in allen Belangen erleichtert. Auch bei allen neuen und alten Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe (Julia, Kristina, Martin, Rouven und der AG Dittmer im RKH) möchte ich mich für die netten Diskussionen, Unterstützung, Expertise und Spaß bei der Arbeit bedanken.

Vielen Dank an Tobi und Julia für die Entfernung von eingeschlichenen Fehlern in dieser Doktorarbeit.

Mein herzlicher Dank geht an meine Familie und Freunde.

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.6 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Modulation von Retrovirus-spezifischen CD8⁺ T Zell Antworten durch Interferon α Subtypen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Julia Dickow befürworte.

Essen, den _____

Ulf Dittmer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Julia Dickow

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Julia Dickow